



T
E
S
I
S

D
O
C
T
O
R
A
L

2
0
2
0

*OPTIMIZACIÓN DEL ENVASADO Y
CONSERVACIÓN REFRIGERADA DE DORADA
(Sparus aurata) FRESCA DE ACUICULTURA,
ENTERA Y FILETEADA*

*Técnicas Avanzadas en Investigación y
Desarrollo Agrario y Alimentario*



Autor: Laura Navarro Segura

Director/es: Antonio López Gómez

María Ros Chumillas

Cartagena 2020



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

Tesis Doctoral

**OPTIMIZACIÓN DEL ENVASADO Y CONSERVACIÓN
REFRIGERADA DE DORADA (*Sparus aurata*) FRESCA
DE ACUICULTURA, ENTERA Y FILETEADA**

LAURA NAVARRO SEGURA

Dirigida por

Dr. Antonio López Gómez

Dra. María Ros Chumillas

2020

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

D. Francisco Artés Hernández, Presidente de la Comisión Académica del Programa Doctorado en Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, “Optimización del envasado y conservación refrigerada de dorada (*sparus aurata*) fresca de acuicultura, entera y fileteada”, ha sido realizada, dentro del mencionado Programa de Doctorado, por D^a. Laura Navarro Segura, bajo la dirección y supervisión de los Drs. Antonio López Gómez y María Ros Chumillas.

En reunión de la Comisión Académica, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director/a de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado.

- × Evaluación positiva del plan de investigación y documento de actividades por el Presidente de la Comisión Académica del programa (**RAPI**).

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

- ☐ Ciencias
- ☐ Ciencias Sociales y Jurídicas
- × Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 11 de mayo de 2020

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA

Fdo: _____



FRANCISCO DE ASIS|ARTES|
HERNANDEZ

2020.05.11 16:46:21 +02'00'

COMITÉ DE DIRECCIÓN ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Sra. Dña. Laura Navarro Segura

Vista la documentación presentada por **Dña. Laura Navarro Segura** en su solicitud de autorización de depósito de tesis doctoral y, al amparo de lo dispuesto en el artículo 24 del Reglamento de Estudios Oficiales de Doctorado de la Universidad Politécnica de Cartagena, aprobado en Consejo de Gobierno el 17 de diciembre de 2015, el Comité de Dirección de la Escuela Internacional de Doctorado de la UPCT, en reunión celebrada el 25 de mayo de 2020,

ACUERDA

Autorizar el depósito de tesis doctoral titulada: “Optimización del envasado y conservación refrigerada de la dorada (*Sparus aurata*) fresca de acuicultura, entera y fileteada”, presentada por Dña. Laura Navarro Segura.

Contra el presente acuerdo, que no agota la vía administrativa, podrá formular recurso de alzada ante el Sr. Rector Magnífico de la Universidad Politécnica de Cartagena, en el plazo de un mes a partir del día siguiente a la fecha de notificación de la presente.

Cartagena, 25 de mayo de 2020

EL DIRECTOR DE LA ESCUELA
INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**PABLO SALVADOR|
FERNANDEZ|
ESCAMEZ**

Firmado digitalmente por PABLO SALVADOR|
FERNANDEZ|ESCAMEZ
Nombre de reconocimiento (DN): cn=PABLO
SALVADOR|FERNANDEZ|ESCAMEZ,
serialNumber=, givenName=PABLO
SALVADOR, sn=FERNANDEZ ESCAMEZ,
ou=CIUDADANOS, o=ACCV, c=ES
Fecha: 2020.05.25 13:02:47 +02'00'

Fdo.: Pablo Fernández Escámez

Nuestros complejos son la fuente de nuestra
debilidad; pero con frecuencia, son también
la fuente de nuestra fuerza

Sigmund Freud

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Todo trabajo requiere de esfuerzo y sacrificio, pero también se obtiene una recompensa y, en este apartado, me gustaría agradecer el apoyo y ayuda prestados a todas esas personas e instituciones que han colaborado en la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, agradecer a mi director de tesis, Dr. Ing. Antonio López Gómez por haberme brindado la oportunidad de entrar en su equipo de investigación y depositar su confianza en mí para desarrollar esta tesis.

A mi codirectora de tesis, May Ros Chumillas. Quiero expresarte tanta gratitud que no serán suficientes estas palabras. Gracias, porque sin tu dedicación, apoyo y comprensión, esto no hubiera sido posible. Por tu paciencia, sinceridad y por ser una compañera más, por guiarme y hacer más fácil este largo camino, por enseñarme a mirar las cosas con positividad y aprender día tras día que cualquier pequeño detalle cuenta. Gracias por todo.

Agradezco a las compañías Pescados de Acuicultura de Murcia S.L. (PESCAMUR) y CUBIPLAYA S.L. por haber financiado los trabajos experimentales de esta tesis a través del proyecto CDTI ref. IDI-20150100 y el proyecto H2020-SME Instrument fase II ref. Agreement – 804493, respectivamente, y por poner a nuestra disposición las muestras de pescado y sus instalaciones siempre que ha sido necesario.

Agradecer a Amanda, Alfonsa e Isabel, de la Universidad de Murcia, la colaboración conjunta llevada a cabo en estos proyectos.

A mis compañeros del grupo de investigación al que pertenezco, que han estado y están. Mis chicas IFSA, Sonia, Laura, Vera y, en especial, a mi Marijose, gracias por vuestra amistad, cariño y calor humano durante estos años, por todos esos momentos de risas y locura tan necesarios, de sobremesa y reflexión y por cuidarme en situaciones difíciles.

Ginés Benito, gracias por compartir tu sabiduría y experiencia. Javi, Marta Barón, Elisa, Alejandra y Sergio, gracias por vuestro compañerismo y alegría, porque hacéis que el trabajo a vuestro lado sea más fácil. Y a los que, con su breve paso, dejaron huella contagiando su simpatía y ganas de aprender.

Noelia y Elena gracias por vuestra amistad, sabios consejos, disposición y cariño. José Ginés, Gerardo, Marta Clemente, Alejo, Alberto, gracias por vuestra ayuda, sinceridad y buen humor.

Al personal técnico de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Instituto de Biotecnología Vegetal y SAIT, Fermín, Mariano, Perla y M^a José Roca, gracias por vuestra cordialidad, paciencia, apoyo y profesionalidad.

A mis amigos, en especial a Ángela, gracias por su ánimo y comprensión.

A mi FAMILIA. A mis padres por ser un pilar fundamental en mi vida. Por creer en mí y apoyarme siempre en todos mis proyectos, porque esto no habría sido posible sin vosotros. A mis abuelas, tíos, primos y cuñados, por su disponibilidad y sus siempre sinceras palabras desde el cariño.

Por último, a Jose, mi compañero de experiencias y aprendizaje en la vida, gracias por tu paciencia, comprensión y amor incondicional. Por aguantarme y quererme en los momentos más difíciles y porque todo sería diferente sin ti.

Y por supuesto, a los más importantes, mis pequeños gigantes, Víctor y Andrés, mi fuente de inspiración y de superación. Los que te sacan una sonrisa en los momentos más duros, por los que das la vida sin importar nada, los que me han enseñado qué es amar de verdad. Porque esto no hubiera sido posible sin ellos.

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL

Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., López-Cánovas, A.E., García-Ayala, A., & López-Gómez, A. (2019). Nanoencapsulated essential oils embedded in ice improve the quality and shelf life of fresh whole seabream stored on ice. *Heliyon* 5, e01804. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01804>.

Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., Martínez-Hernández, G.B., López-Gómez, A. (2020). A new advanced packaging system for extending the shelf life of refrigerated farmed fish fillets. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (**aceptado**) <https://doi.org/10.1002/jsfa.10520>.

Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., Martínez-Hernández, G.B., López-Gómez, A. (2020). A novel preserving technology with antimicrobial ice on the quality and shelf life of sea bass (*Dicentrarchus labrax*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and salmon (*Salmo salar*) (en preparación).

López-Cánovas, A.E., Cabas, I., Ros-Chumillas, M., Navarro-Segura, L., López-Gómez, A., & García-Ayala, A. (2019). Nanoencapsulated clove essential oil applied in low dose decreases stress in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during slaughter by hypothermia in ice slurry. *Aquaculture*, 504, 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.02.003>

TRABAJOS PRESENTADOS A CONFERENCIAS O CONGRESOS

Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., López-Cánovas, A.E., García-Ayala, A., López-Gómez, A. (2017). Ice including nanoencapsulated essential oils improves the shelf-life of farmed fresh sea bream *Sparus aurata*. *Proc. Aquaculture Europe 2017 Congress - Cooperation for Growth* (Dubrovnik, Croacia), October 16-20.

Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., López-Gómez, A. (2017). Optimization of packaging and refrigerated preservation of fresh sea bream (*Sparus aurata*) from aquaculture, intact and in fillets. *Proceedings of the 6th Workshop on Agri-Food Research for young researchers*. CRAI Biblioteca, Universidad Politécnica de Cartagena. ISBN: 978-84-16325-64-1. Open access <http://hdl.handle.net/10317/6706>. Pags: 163-166.

López-Cánovas, A.E., Ros-Chumillas, M., Navarro-Segura, L., López-Gómez, A., Cabas, I., & García-Ayala, A. (2017). Nanoencapsulated clove essential oil used in stunning during slaughtering operation improves the quality and shelf-life of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and decreases fish wastes in the urban consumption chain. Proc. CONAMA, Valencia, España.

Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., López-Gómez, A. (2018). Influence of the refrigerated storage temperature on shelf life of seabream fillets. *Proceedings of the 7th Workshop on Agri-Food Research for young researchers*. CRAI Biblioteca, Universidad Politécnica de Cartagena, ISBN: 978-84-16325-89-4. Open access <http://hdl.handle.net/10317/7652>. Pags: 30-33.

López-Gómez, A., Ros-Chumillas, M., Navarro-Segura, L., Soto-Jover, S. (2018). Estudio de la vida útil de dorada fresca almacenada en hielo con aceites esenciales nanoencapsulados. *CYTEF2018, Actas IX Congreso Ibérico/VII Congreso Iberoamericano de Ciencias y Técnicas del Frío*, Valencia (España), 19-21 junio.

López-Gómez, A., López-Cánovas, A.E., Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., Cabas, I., García-Ayala, A. (2018). Effect of encapsulated essential oils embedded in the ice used during stunning and slaughtering, and in cold storage, on fresh farmed sea bream *Sparus aurata* L. shelf life. *Proc. AQUA2018 Int Conference* (World Aquaculture Society Meetings). Montpellier (France), 25-29 Agosto

Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., López-Gómez, A. (2019). Influence of antimicrobial ice on the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored at room temperature. *Proceedings of the 8th Workshop on Agri-Food Research for young researchers*. CRAI Biblioteca, Universidad Politécnica de Cartagena. ISBN: 978-84-17853-08-2. 171 pp. Open access <http://hdl.handle.net/10317/8367>. Pags: 32-35.

López-Gómez A., Navarro-Segura L., Ros-Chumillas M. (2019) The use of nanoencapsulated essential oils embedded in the ice has an antimicrobial effect and extends the shelf life of refrigerated fresh sea bream with ice topping. *Proceedings of the 25th IIR International Congress of Refrigeration*, Montréal, Canada, August 24-30, 2019. 2019/08/24, DOI: <http://dx.doi.org/10.18462/iir.icr.2019.0575>.

ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INTERNACIONALES, DERIVADOS DE COLABORACIONES EN OTRAS INVESTIGACIONES

Buendía-Moreno, L., Sonia Soto-Jover, María Ros-Chumillas, Vera Antolinos-Lopez, Laura Navarro-Segura, María José Sánchez-Martínez, Ginés Benito Martínez-Hernández, Antonio López-Gómez. (2020). An innovative active cardboard box for bulk packaging of fresh bell pepper. *Postharvest Biology and Technology*, 164: 111171. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111171>

Buendía-Moreno, L., María Ros-Chumillas, Laura Navarro-Segura, María José Sánchez-Martínez, Sonia Soto-Jover, Vera Antolinos-Lopez, Ginés Benito Martínez-Hernández, Antonio López-Gómez. (2020). Active cardboard box with a coating including essential oils entrapped within cyclodextrins and/or halloysite nanotubes. A case study for fresh tomato storage. *Food Control*, 107, 106763 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106763>

Buendía-Moreno, L., Sonia Soto-Jover, María Ros-Chumillas, Vera Antolinos-Lopez, Laura Navarro-Segura, María José Sánchez-Martínez, Ginés Benito Martínez-Hernández, Antonio López-Gómez (2020). Innovative cardboard active packaging with a coating including encapsulated essential oils to extend cherry tomato shelf life. *LWT-Food Science and Technology*, 116, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108584>

Buendía-Moreno, L., María Ros-Chumillas, Laura Navarro-Segura, María José Sánchez-Martínez, Sonia Soto-Jover, Vera Antolinos-Lopez, Ginés Benito Martínez-Hernández, Antonio López-Gómez. (2020). Effects of an active cardboard box using encapsulated essential oils on the tomato shelf life. *Food and Bioprocess Technology*, 12(9), 1548-1558 <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02311-0>

TRABAJOS PRESENTADOS A CONFERENCIAS O CONGRESOS, DE COLABORACIONES EN OTRAS INVESTIGACIONES.

López-Gómez A., Ros-Chumillas M., Navarro-Segura L., Soto-Jover, S., Navarro-Segura, L., Buendía-Moreno, L., Antolinos-López, V., Sánchez-Martínez, M.J. (2019) The treatment with vapors of essential oils in the vacuum cooling has a significant effect on surface microbial decontamination of fresh vegetables. *Proceedings of the 25th IIR International Congress of Refrigeration*, Montréal, Canada, August 24-30, 2019. 2019/08/24, DOI: <http://dx.doi.org/10.18462/iir.icr.2019.0575>.

PREMIOS OBTENIDOS

López-Cánovas, A.E., Cabas, I., Ros-Chumillas, M., Navarro-Segura, L., López-Gómez, A., García-Ayala, A., Mulero-Méndez, V.F. XVI Premio Nacional de Investigación en Acuicultura (JACUMAR 2017), otorgado por el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, al trabajo sobre “El aturcido y sacrificio de peces de acuicultura con aceite esencial de clavo nanoencapsulado embebido en cristales de hielo disminuye el sufrimiento animal y mejora la calidad y la vida útil del pescado refrigerado”.

ÍNDICE



ÍNDICE DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE IMÁGENES	III
ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	XIII

RESUMEN	1
SUMMARY	3
PARTE I. ANTECEDENTES	5
CAPÍTULO 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	7
1.1. Justificación	9
1.2. Objetivos generales y específicos	10
1.2.1. Objetivos generales	10
1.2.2. Objetivos específicos	10
1.3. Estructura del documento	12
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	13
2.1. Estado actual de la acuicultura	15
2.1.1. Importancia de la acuicultura	15
2.1.2. Producción de especies de acuicultura mundial y nacional	15
2.1.3. Consumo de pescado de acuicultura	18
2.1.4. La acuicultura en la Región de Murcia	19
2.1.5. Desperdicio de pescado a nivel mundial	20
2.2. Cultivo de la Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	20

2.3. Cultivo de otras especies de interés	22
2.3.1. Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	22
2.3.2. Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	22
2.3.3. Salmón (<i>Salmo salar</i>)	23
2.4. Carácter perecedero del pescado: Mecanismos de degradación	24
2.4.1. Degradación enzimática	24
2.4.2. Degradación bacteriana	25
2.4.3. Degradación por oxidación lipídica	26
2.5. Métodos de conservación y envasado de pescado	27
2.5.1. Refrigeración y congelación	27
2.5.2. Conservación en hielo	28
2.5.3. Envasado en atmósfera modificada	29
2.5.4. Envasado al vacío	31
2.5.5. Envasado activo	32
2.6. Recientes desarrollos en envasado activo de pescado	33
2.6.1. Uso de los aceites esenciales en el envasado activo	33
2.6.1.1. Aplicación directa en estado vapor	34
2.6.1.2. Nanoemulsión	35
2.6.1.3. Encapsulados en el material de envasado	37
2.6.1.4. Películas comestibles “Edible Coating”	39
2.6.2. Técnicas combinadas de envasado	40
2.6.2.1. Hielo antimicrobiano (con aceites esenciales)	41
2.6.2.2. Envasado en atmósfera modificada aplicando aceites esenciales	42

2.6.2.3. Envasado al vacío incluyendo aceites esenciales	43
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. Material utilizado	47
3.2. Tecnologías aplicadas de descontaminación y envasado de pescado fileteado	48
3.2.1. Condiciones de fileteado y envasado de la dorada	48
3.2.2. Envasado en atmósfera modificada (MAP)	49
3.2.3. Descontaminación mediante baño por inmersión en nanoemulsión de aceite esencial de orégano	50
3.2.4. Descontaminación mediante aplicación de vapores de aceites esenciales en el envasado MAP, envasado activo	51
3.3. Formación y caracterización del complejo de inclusión para producción de hielo antimicrobiano como conservante de dorada entera	51
3.3.1. Materiales utilizados para la formación del complejo de inclusión	51
3.3.2. Metodología utilizada para la producción del complejo de inclusión y fabricación del hielo antimicrobiano	52
3.3.3. Caracterización del complejo de inclusión mediante diferentes técnicas	53
• <i>Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)</i>	53
• <i>Eficiencia de atrapamiento (% EE)</i>	54
• <i>Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)</i>	54
• <i>Microscopía electrónica de barrido (SEM)</i>	55
3.4. Análisis microbiológicos	56
3.5. Análisis físico-químicos	57

3.5.1. Determinación de pH	57
3.5.2. Determinación de la capacidad de retención de agua (CRA)	58
3.5.3. Determinación del color CIElab	58
3.5.4. Análisis del perfil de textura (TPA)	59
3.5.5. Determinación del Nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA)	60
3.6. Evaluación sensorial	61
3.7. Análisis estadístico	63

PARTE II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (Dorada fileteada)

CAPÍTULO 4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN SOBRE LA VIDA ÚTIL DE FILETES DE DORADA	67
4.1. Introducción	69
4.2. Plan experimental	71
4.3. Resultados y discusión	72
4.3.1. Análisis microbiológico	72
4.3.2. Análisis físico-químicos	74
4.3.3. Evaluación sensorial	80
4.4. Conclusiones	81
CAPÍTULO 5. ESTUDIO DE NUEVOS SISTEMAS DE ENVASADO ACTIVO ANTIMICROBIANO CON PROCESADO MÍNIMO PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE FILETES FRESCOS DE DORADA	83
5.1. Introducción	85
5.2. Plan experimental	87
5.3. Resultados y discusión	89
5.3.1. Análisis microbiológico	89

5.3.2. Análisis físico-químicos	94
5.3.3. Evaluación sensorial	106
5.4. Conclusiones	107
CAPÍTULO 6. DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA DE DESCONTAMINACIÓN SUPERFICIAL Y ENVASADO MAP PARA EXTENDER LA VIDA ÚTIL DE FILETES DE DORADA	109
6.1. Introducción	111
6.2. Plan experimental	113
6.3. Resultados y discusión	115
6.3.1. Análisis microbiológico	115
6.3.2. Análisis físico-químicos	119
6.3.3. Evaluación sensorial	128
6.4. Conclusiones	129
PARTE III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN (Pescado entero)	
CAPÍTULO 7. INFLUENCIA DE NUEVOS SISTEMAS DE ENVASADO ACTIVO ANTIMICROBIANO SOBRE EL INCREMENTO DE LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE DORADA ENTERA	133
7.1. Introducción	135
7.2. Plan experimental	137
7.3. Resultados y discusión	138
7.3.1. Análisis microbiológico	138
7.3.2. Análisis físico-químicos	142
7.3.3. Evaluación sensorial	149
7.4. Conclusiones	151

CAPÍTULO 8. ESTUDIO DE CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE DORADA ENTERA ATURDIDA Y CONSERVADA CON HIELO INCLUYENDO ACEITES ESENCIALES NANOENCAPSULADOS	153
8.1. Introducción	155
8.2. Plan experimental	156
8.3. Resultados y discusión	157
8.3.1. Caracterización del complejo de inclusión	157
8.3.2. Análisis microbiológico	161
8.3.3. Análisis físico-químicos	165
8.3.4. Evaluación sensorial	169
8.4. Conclusiones	170
 CAPÍTULO 9. VALIDACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE CONSERVACIÓN CON HIELO ANTIMICROBIANO SOBRE LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE LUBINA, TRUCHA ARCOÍRIS Y SALMÓN ENTEROS FRESCOS	 173
9.1. Introducción	175
9.2. Plan experimental	176
9.3. Resultados y discusión	177
9.3.1. Análisis microbiológico	177
9.3.2. Análisis físico-químicos	185
9.3.3. Evaluación sensorial	191
9.4. Conclusiones	197
 PARTE IV. CONCLUSIONES Y BIBLIOGRAFÍA	
 CAPÍTULO 10. CONCLUSIONES GENERALES	 201
CAPÍTULO 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	205

INDICE DE ABREVIATURAS

AEO	Aceite esencial de orégano
AEs	Aceites esenciales
AMT	Microorganismos aerobios mesófilos totales
ANOVA	Análisis de varianza
atm	Atmósfera
ATP	Adenosin trifosfato
BAL	Bacterias Ácido-lácticas
CBP	Carvacrol:Bergamota:Pomelo
CRA	Capacidad de retención de agua
CEO	Aceite esencial de clavo (Clove essential oil)
CDs	Ciclodextrinas
cm	Centímetros
CO₂	Dióxido de carbono
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido (Differential scanning calorimetry)
EE	Eficiencia de atrapamiento (Entrapment efficiency)
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (Fourier transform infrared spectroscopy)
g	Gramos
hPa	Hectopascal
HR	Humedad relativa
kg	Kilogramos
L	Litro
Log	Logaritmo
MAP	Envasado en atmósfera modificada (Modified atmosphere packaging),
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
mg	Miligramo
m²	Metros cuadrados

m³	Metros cúbicos
ml	Mililitro
mm	Milímetros
n	Número de muestras
N	Newtons
N₂	Nitrógeno
nm	Nanómetro
N-TMA	Nitrógeno de trimetilamina
O₂	Oxígeno
p/p	Peso/peso
QIM	Método del índice de calidad (Quality Index Method)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SD	Desviación estándar (Standard deviation)
SEM	Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy)
TMAO	Óxido de trimetilamina
UFC	Unidades formadoras de colonias
v/v	Volumen/volumen
µg	Microgramo
µL	Microlitro

ÍNDICE DE IMÁGENES

Capítulo 2

Imagen 2.1.	Apariencia de la Dorada (<i>Sparus aurata</i>) (MAPA, 2020).	21
Imagen 2.2.	Apariencia de la especie Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>) (MAPA, 2020b).	22
Imagen 2.3.	Apariencia de la Trucha Arco Iris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) (MAPA, 2020c).	23
Imagen 2.4.	Apariencia de la especie Salmón (<i>Salmo salar</i>).	23

Capítulo 3

Imagen 3.1.	Detalle de la dorada entera y fileteada utilizada en los ensayos realizados en esta tesis.	47
Imagen 3.2.	Interior de sala blanca clase 10000 utilizada en el fileteado y envasado ultralimpio, dotada de cabina de flujo laminar clase 100 (izda de la foto) y termoselladora con atmósfera modificada (fondo de la sala).	49
Imagen 3.3.	Equipo de termosellado y aplicación de atmósfera modificada (envasado MAP) modelo Efaman (Efabin, Murcia).	50
Imagen 3.4.	Detalle de la descontaminación de filetes de dorada con nanoemulsión de AEO.	50
Imagen 3.5.	Detalle de aplicación de hielo sobre dorada entera.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 2.1.	Distribución de la producción de acuicultura por los cinco continentes (APROMAR 2019 y FAO 2018a).	16
Figura 2.2.	Distribución porcentual de la producción de la acuicultura mundial (t) en 2017 por grupos y por entornos de producción (APROMAR 2019 y FAO 2018a).	17
Figura 2.3.	Producción de acuicultura (t) en la Unión Europea y su valor (millones de €) en 2017 (FAO, 2018a y APROMAR, 2019).	17
Figura 2.4.	Distribución porcentual de las producciones (toneladas) de dorada (A) y lubina (B) en España por Comunidades Autónomas en 2018. APROMAR 2019.	19
Figura 2.5.	Estructura molecular y dimensiones geométricas de las diferentes ciclodextrinas: α -CD, β -CD y γ -CD (Modificado de Crini, 2014).	38
Figura 2.6.	Esquema de la estructura funcional de las CDs (Crini, 2014).	38

Capítulo 3

Figura 3.1.	Esquema detallado del sistema de inyección de vapores de AEs, por diferencia de presión, sobre el producto antes del envasado MAP (López-Gómez y López-Cánovas, 2016).	51
Figura 3.2.	Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (Clavijo, 2013).	56
Figura 3.3.	Curva teórica para el análisis de Perfil de Textura (Bourne, 1978).	60

Capítulo 4

Figura 4.1.	Plan experimental para el estudio de determinación de la temperatura más adecuada de conservación de filetes de dorada con envasado MAP.	71
Figura 4.2.	Recuentos (log UFC/g) de <i>Enterobacteriaceae</i> spp. (A), microorganismos psicrófilos (B), bacterias ácido lácticas (C) y <i>Pseudomonas</i> sp. (D) en filetes de dorada almacenados a 4 °C (●), 2 °C (▲) y 1 °C (■).	72
Figura 4.3.	Recuentos (Log UFC/g) de microorganismos aerobios mesófilos (AMT) en filetes de dorada almacenados a 4 °C (●), 2 °C (▲) y 1 °C (■).	73
Figura 4.4.	Evolución del N-TMA (mg/100g) en filetes de dorada durante el almacenamiento a 4 °C (barra blanca), 2 °C (barra negra) y 1 °C (barra gris), (n=3±SD).	79
Figura 4.5.	Puntuaciones QIM de filetes de dorada cocinados tras su conservación en MAP a las temperaturas de 4 °C (●), 2 °C (▲) y 1 °C (■).	80

Capítulo 5

Figura 5.1.	Plan experimental para el estudio de vida útil de filetes de dorada aplicando distintas tecnologías de descontaminación y envasado MAP para su conservación a diferentes temperaturas.	87
Figura 5.2.	Evolución del N-TMA (mg N/100g) en filetes de dorada CTRL (A), con nanoemulsión de AEO (B) y vapor de AEO (C) durante el almacenamiento a 1 °C (barras negras), 2 °C (barras gris oscuro) y 4 °C (barras gris claro) (n=3±SD).	104

Figura 5.3.	Evolución del N-TMA (mg/100g) en filetes de dorada CTRL (barras grises), descontaminados con nanoemulsión de AEO (barras punteadas) y con vapor de AEO (barras rayadas) almacenados 2 °C (n=3±SD).	105
Figure 5.4.	Puntuaciones QIM de filetes de dorada cocinados (n=3±SD). Muestras no tratadas (CTRL, ●); descontaminación de los filetes por inmersión con nanoemulsión de AEO (TN, ■); filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (T3, ▲).	106

Capítulo 6

Figura 6.1.	Plan experimental para el estudio de determinación de vida útil de filetes de dorada aplicando distintas tecnologías de descontaminación y envasado MAP.	113
Figura 6.2.	Evolución del crecimiento de <i>Enterobacteriaceae spp.</i> en filetes de dorada envasados en MAP durante su conservación a 4 °C (n=3±SD). Muestras no tratadas (CTRL, ○); descontaminación del pescado entero por inmersión con nanoemulsión de AEO (T1, ■); tratamiento T2: T1+inmersión de los filetes en nanoemulsión con AEO (T2, ▲); tratamiento T3: filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (T3, ×).	116
Figura 6.3.	Carga microbiana de <i>Pseudomonas sp.</i> (A), bacterias ácido lácticas (B), aerobios mesófilos (C) y psicrófilos totales (D) en los filetes de dorada envasados en MAP durante su conservación a 4 °C (n=3±SD). Muestras no tratadas (CTRL, ○); descontaminación del pescado entero por inmersión con nanoemulsión de AEO (T1, ■); tratamiento T2: T1+inmersión de los filetes en nanoemulsión con AEO (T2, ▲); tratamiento T3: filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (T3, ×).	117

Figura 6.4.	Puntuaciones QIM de filetes de dorada envasadas en MAP durante el almacenamiento a 4 °C (n=3±SD). Muestras no tratadas (CTRL, ○); descontaminación del pescado entero por inmersión con nanoemulsión de AEO (T1, ■); tratamiento T2: T1+inmersión de los filetes en nanoemulsión con AEO (T2, ▲); tratamiento T3: filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (T3, ×).	128
--------------------	--	-----

Capítulo 7

Figura 7.1.	Esquema del plan experimental para el estudio de determinación de la vida útil de dorada entera fresca conservada en hielo y a 2 °C.	137
Figura 7.2.	Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de <i>Enterobacteriaceae spp.</i> en doradas CTRL (hielo normal) (●), H1 (50 mg/kg de β-CD+CBP) (▲) y H2 (100 mg/kg de β-CD+CBP) (■) durante su período de almacenamiento a 2 °C.	139
Figura 7.3.	Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de <i>Pseudomonas sp.</i> en doradas almacenadas con hielo normal (●), H1 (50 mg/kg de β-CD+CBP) (▲) y H2 (100 mg/kg de β-CD+CBP) (■) durante 16 días de almacenamiento a 2 °C.	139
Figura 7.4.	Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de aerobios mesófilos totales (AMT) en doradas almacenadas con hielo normal (●), hielo con 50 mg/kg de β-CD+CBP (▲) y hielo con 100 mg/kg de β-CD+CBP (■) durante 16 días de almacenamiento a 2 °C.	140
Figura 7.5.	Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de microorganismos aerobios psicrófilos en doradas almacenadas con hielo normal (●), hielo con 50 mg/kg de β-	141

CD+CBP (▲) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (■) durante 16 días de almacenamiento a 2 °C.

- Figura 7.6.** Evolución del N-TMA (mg/100g) en filetes de dorada envasadas en hielo picado normal (CTRL) (barra negra), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H1) (barra gris) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H2) (barra blanca) durante su período de almacenamiento a 2°C (n=3 \pm SD). 148
- Figura 7.7.** QIM, puntuación de doradas frescas envasadas con hielo CTRL (●), H1 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲) y H2 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (■) durante su almacenamiento a 2 °C. 149
- Figura 7.8.** QIM, puntuación de doradas cocinadas envasadas con hielo CTRL (●), H1 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲) y H2 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (■) durante su período de almacenamiento a 2 °C. 150
- Figura 7.9.** Detalle de la apariencia general de las doradas almacenadas en hielo CTRL, H50 y H100 en los días 7, 13 y 16 de análisis a 2 °C. 151

Capítulo 8

- Figura 8.1.** Termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de carvacrol (línea discontinua) y del complejo de inclusión β -CD-carvacrol (línea continua). 158
- Figura 8.2.** Termogramas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la combinación de AEs carvacrol, bergamota y pomelo (3:1:1) (línea discontinua) y del complejo de inclusión CBP+ β -CD (línea continua). 158
- Figura 8.3.** Espectro FTIR obtenido por la mezcla CBP (línea continua), moléculas β -CD (línea punteada) y el complejo de inclusión 159

CBP+ β -CD (línea discontinua) en el rango espectral de 3600 a 2400 cm^{-1} .

- Figura 8.4.** Espectro FTIR obtenido por β -CD (línea continua) y el complejo de inclusión CBP+ β -CD (línea punteada) en el rango espectral de 3600 a 2400 cm^{-1} . 160
- Figura 8.5.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para el complejo de inclusión CBP+ β -CD con 200x (A) y con 2000x (B). 161
- Figura 8.6.** Evolución en los recuentos de *Enterobacteriaceae spp.* de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua). 162
- Figura 8.7.** Evolución en los recuentos de *Pseudomonas sp.* de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua). 162
- Figura 8.8.** Evolución en los recuentos de AMT de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua). 163
- Figura 8.9.** Evolución en los recuentos de microorganismos psicrófilos totales de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua). 164

Figura 8.10.	Evaluación sensorial de las doradas frescas con diferentes tratamientos durante su conservación en hielo y a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua).	169
---------------------	---	-----

Capítulo 9

Figura 9.1.	Plan experimental desarrollado para el estudio de determinación de la vida útil de lubina, trucha arcoíris y salmón enteros conservados en hielo y a 2 °C.	176
Figura 9.2.	Evolución de la carga de <i>Entobacteriaceae</i> spp. (A) y <i>Pseudomonas</i> sp. (B) en lubinas enteras durante su período de conservación en hielo y a 2 °C (n=3±SD). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas).	179
Figura 9.3.	Evolución de la carga de AMT (A) y Psicrófilos (B) en lubinas enteras durante su período de conservación en hielo y a 2 °C (n=3±SD). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas).	180
Figura 9.4.	Evolución de la carga de <i>Enterobacteriaceae</i> spp. (A), <i>Pseudomonas</i> sp. (B) y Psicrófilos (C) en truchas arcoíris enteras durante su período de conservación en hielo y a 2 °C (n=3±SD). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas).	181
Figura 9.5.	Evolución de la carga de AMT (A) y Psicrófilos (B) en salmones enteros durante su período de conservación en hielo y a 2 °C (n=3±SD). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas).	184
Figura 9.6.	QIM, puntuación de lubinas frescas envasadas con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β-CD+CBP) (▲), H75 (75	192

mg/kg de β -CD+CBP) (■) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (♦) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3±SD).

- Figura 9.7.** Detalles de aspecto general y estado del ojo y agallas de lubinas conservadas en hielo normal (CTRL) y hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) a 2 °C al final del período de conservación (día 22). 193
- Figura 9.8.** QIM, puntuación de truchas arcoíris frescas envasadas con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲), H75 (75 mg/kg de β -CD+CBP) (■) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (♦) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3±SD). 194
- Figura 9.9.** Detalles de aspecto general y estado del ojo y agallas de truchas arcoíris conservadas en hielo normal (CTRL) y hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) a 2 °C al final del período de conservación (día 15). 195
- Figura 9.10.** QIM, puntuación de salmones frescos envasados con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲), H75 (75 mg/kg de β -CD+CBP) (■) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (♦) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3±SD). 196
- Figura 9.11.** Detalles de aspecto general y estado del ojo y agallas de salmón conservados en hielo normal (CTRL) y hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) a 2 °C al final del período de conservación (día 13). 196

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2

Tabla 2.1.	Condiciones de cultivo de las especies más producidas en España (APROMAR, 2019).	18
-------------------	--	----

Capítulo 3

Tabla 3.1.	Cantidades y compuestos para realizar la curva de calibración utilizada en la determinación de la Trimetilamina.	61
Tabla 3.2.	Tabla de valoración sensorial de dorada fresca según los parámetros QIM. (Cakli <i>et al.</i> (2007) y Erikson <i>et al.</i> (2019).	62

Capítulo 4

Tabla 4.1.	Valores de pH en filetes de dorada almacenados a 4, 2 y 1 °C (n=3±SD).	75
Tabla 4.2.	Valores de capacidad de retención de agua (CRA) en filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).	75
Tabla 4.3.	Evolución de los parámetros de color en filetes de dorada durante su período de conservación a las temperaturas de 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).	77
Tabla4.4.	Evolución del análisis de perfil de textura (TPA) en filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).	78

Capítulo 5

Tabla 5.1.	Evolución del crecimiento de microorganismos en filetes de dorada durante su período de conservación a las temperaturas de 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).	90
Tabla 5.2.	Evolución de los parámetros de Color, pH y CRA de filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).	97
Tabla 5.3.	Evolución de los parámetros de textura en filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).	101

Capítulo 6

Tabla 6.1.	Evolución del parámetro pH durante la conservación de filetes de dorada a 4 °C, CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).	119
Tabla 6.2.	Resultados obtenidos de los parámetros de color en filetes de dorada durante su período de conservación a 4 °C; CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).	122
Tabla 6.3.	Resultados del análisis de perfil de textura de filetes de dorada durante su período de conservación a 4 °C. CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).	125

Tabla 6.4.	Evolución del contenido de N-TMA en filetes de dorada durante su conservación a 4 °C. CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).	127
-------------------	---	-----

Capítulo 7

Tabla 7.1.	Valores de pH para doradas enteras envasadas en hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H1) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H2) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3±SD).	142
Tabla 7.2.	Evolución de la CRA para doradas enteras envasadas en hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H1) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H2) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3±SD).	143
Tabla 7.3.	Evolución de los parámetros de color en doradas enteras envasadas en hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H1) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H2) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3±SD).	144
Tabla 7.4.	Evolución de textura para dorada entera envasada con hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H1) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H2) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3±SD).	147

Capítulo 8

Tabla 8.1.	Evolución de pH en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C (n=3±SD).	165
Tabla 8.2.	Evolución de la CRA en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C (n=3±SD).	166

Tabla 8.3.	Evolución en los parámetros de color en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C (n=3±SD).	167
Tabla 8.4.	Evolución de los valores de N-TMA en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C (n=3±SD).	168

Capítulo 9

Tabla 9.1.	Evolución de la CRA en salmón entero durante su conservación en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50 mg AEs/kg (H50), de 75 mg AEs/kg (H75) y de 100 mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C (n=3±SD).	186
Tabla 9.2.	Evolución de N-TMA en lubina conservada en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50 mg AEs/kg (H50), de 75 mg AEs/kg (H75) y de 100 mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C (n=3±SD).	189
Tabla 9.3.	Evolución de N-TMA en trucha arcoíris conservada en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50 mg AEs/kg (H50), de 75 mg AEs/kg (H75) y de 100 mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C (n=3±SD).	190
Tabla 9.4.	Evolución de N-TMA en salmón conservado en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50 mg AEs/kg (H50), de 75 mg AEs/kg (H75) y de 100 mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C (n=3±SD).	191

RESUMEN

ABSTRACT



RESUMEN

El pescado es un alimento de gran calidad por sus características nutricionales y sus múltiples beneficios para la salud. La dorada (*Sparus aurata*), en particular, presenta un gran valor para la gastronomía a nivel mundial y su producción en acuicultura ha registrado un gran incremento estos últimos años debido a la alta demanda por el consumidor. Sin embargo, la principal problemática que presenta el pescado es su corta vida útil durante su comercialización, ya que es un producto muy perecedero. Es por ello que, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la mejora integral de la calidad de la dorada de acuicultura, con el fin de ofrecer un producto de valor añadido, mayor calidad y vida útil. Para ello se han llevado a cabo los estudios detallados a continuación. En primer lugar, se evaluaron diferentes métodos de descontaminación previos al envasado en atmósfera modificada (MAP) de filetes de dorada, basados en tecnologías de aplicación de agentes naturales con carácter antimicrobiano, como son las nanoemulsiones de aceites esenciales (AEs) o AEs aplicados de forma directa en estado vapor. A su vez, se determinó la temperatura óptima de refrigeración para la conservación de los filetes envasados.

En segundo lugar, se llevó a cabo la conservación de dorada entera fresca en hielo picado incluyendo en su fabricación una combinación de AEs (Carvacrol:Bergamota:Pomelo, 3:1:1) a diferentes dosis (50, 75 y 100 mg AEs/kg de hielo) encapsulados en β -ciclodecitrinas (β -CDs) aplicado en un ratio de 1:3 (hielo:pescado), comparando su efecto con el del sistema tradicional con hielo picado normal.

Para determinar la calidad y vida útil de la dorada tanto entera como fileteada, se realizaron determinaciones microbiológicas, físico-químicas y sensoriales (fresco y/o cocinado), así como la caracterización del complejo de inclusión AEs- β -CDs.

Las nuevas tecnologías estudiadas, de descontaminación sobre filetes de dorada y de conservación en hielo antimicrobiano para dorada entera, mostraron una reducción en el crecimiento de microorganismos alterantes del pescado fresco, una mejor percepción sensorial y un menor deterioro del pescado. Se consiguió extender la vida útil tanto de los filetes como de la dorada entera en hasta 7 y 6 días, respectivamente. Ante los resultados obtenidos, se evaluó este nuevo método de conservación con hielo antimicrobiano en otras especies de interés en acuicultura como son lubina, trucha arcoíris y salmón, mostrando resultados similares a los observados en dorada.

SUMMARY

Fish is considered a high-quality food due to its nutritional characteristics and its multiple health benefits. Sea bream (*Sparus aurata*), in particular, shows a great value for gastronomy worldwide and its aquaculture production has increased in recent years owing to the high consumer demand. However, the main problem with fish is its short shelf life, since it is a very perishable product. The main objective of the present Doctoral Thesis has been the enhancement of aquaculture fresh gilthead sea bream quality, to offer a value-added product with higher quality and extended shelf life. In this sense, the studies of new packaging technologies detailed below have been carried out.

Firstly, different decontamination methods, before modified atmosphere packaging (MAP), of gilthead sea bream fillets were evaluated, based on technologies for the application of natural agents with antimicrobial characteristics, such as nanoemulsions of essential oils (AEs) or AEs applied directly in vapour state. Also, the optimum refrigeration temperature for packaged fillets storage was determined.

Secondly, conservation of fresh whole gilthead sea bream on crushed ice was carried out including, in its manufacture, a combination of AEs (Carvacrol: Bergamot: Grapefruit, 3: 1: 1), at different doses (50, 75 y 100 mg AEs / kg of ice), encapsulated in β -cyclodextrins (β -CDs) applied in a ratio of 1: 3 (ice: fish), comparing its effect with the traditional system in normal crushed ice storage.

To determine the quality and shelf life of both, whole and filleted gilthead sea bream, microbiological, physical-chemical and sensory determinations (fresh and / or cooked) were carried out, as well as the characterization of the inclusion complex AEs- β -CDs.

The new technologies studied, decontamination on gilthead sea bream fillets and conservation on antimicrobial ice for whole gilthead sea bream, showed a reduction in spoilage microorganisms growth, better sensory perception and less deterioration of the fish. The shelf life of both, fillets and whole seabream, was extended by up to 7 and 6 days, respectively. Given the results obtained, this new method of conservation with antimicrobial ice was evaluated in other species of interest in aquaculture such as sea bass, rainbow trout and salmon, showing similar results to those observed in sea bream.

PARTE I

Antecedentes



CAPÍTULO 1

Justificación y Objetivos

CAPITULO 1. Justificación y objetivos

1.1. JUSTIFICACIÓN

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado dentro de los siguientes proyectos de investigación:

- “Productos refrigerados de dorada de acuicultura con vida útil extendida”, Entidad financiadora: CDTI (Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial) – Proyecto 2015 de Investigación y Desarrollo (ref. IDI-20150100),
- “Innovative technology based on the integration of natural substances in ice to improve animal welfare and extend shelf-life of farmed fish”. Entidad financiadora: Programa H2020-SME Instrument phase 2, in the area of SMEInst-08-2016-2017: Supporting SMEs efforts for the development – deployment and market replication of innovative solutions for blue growth (ref. Agreement ICE2LAST – 804493).

Que se han llevado a cabo en colaboración con las empresas Pescados de Acuicultura de Murcia S.L. (PESCAMUR) y CUBIPLAYA S.L. (San Pedro del Pinatar, España), y con la colaboración externa de la Universidad Politécnica de Cartagena y Universidad de Murcia.

Por tanto, la justificación de esta Tesis Doctoral se corresponde, en gran parte, con la planteada en los citados proyectos, que pretendían desarrollar nuevas tecnologías de conservación de productos frescos de dorada (pescado entero o fileteado) que le aportaran una mayor calidad y vida útil, y que consiguieran productos de calidad diferenciada y más seguros para el consumidor.

La producción de dorada en España, en la costa mediterránea principalmente, tiene que competir por precio de venta con otros países como Turquía, Grecia, Egipto o Túnez, donde los costes de producción son inferiores. Al mismo tiempo, se tiene la percepción de que la calidad del pescado de acuicultura producido en estos países es inferior. Por tanto, una vía de mejora en cuanto a competitividad puede ser que sean diferenciados estos productos por su mayor calidad y vida útil, y por obtenerse con prácticas de producción que sean más respetuosas con el bienestar animal.

Estas son las razones que justificaron llevar a cabo los estudios incluidos en esta Tesis Doctoral, que se han centrado fundamentalmente en la mejora integral de la calidad de la dorada de acuicultura, y, por extensión, de todo el pescado de acuicultura.

1.2. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

1.2.1. *Objetivos Generales*

Con esta Tesis se pretenden conseguir los siguientes objetivos generales:

- Mejorar la calidad de la dorada (*Sparus aurata*) en sus diferentes formatos refrigerados: como pescado entero, fileteado, y/o mínimamente procesado, y en el aumento de la vida útil de estos productos (combinando la mejora de la calidad inicial del producto y la mejora del sistema de envasado). Este aumento de la calidad y la vida útil de los productos refrigerados implicará un aumento del valor añadido de la dorada de acuicultura, que ayudará a competir en los mercados nacionales e internacionales.
- Mejorar la comercialización de los productos frescos de este tipo de pescado, como pescado entero o fileteado, con un sistema innovador de envasado activo antimicrobiano que permita alargar la vida útil en refrigeración más allá de los 14 días que presentan actualmente estos productos.

1.2.2. *Objetivos Específicos*

En base a los objetivos generales se plantean los siguientes objetivos técnicos específicos:

- Mejora integral de la calidad de los productos frescos de la dorada de acuicultura. Este objetivo se centra tanto en la mejora de la tecnología de aturrido/sacrificio como en las condiciones de enfriamiento postmortem y conservación refrigerada, para conseguir un producto de calidad diferenciada respecto de la competencia que ofrece precios más bajos. Se pretende que los productos frescos de la dorada de acuicultura conserven su frescura más tiempo, tanto el pescado entero fresco como el fileteado fresco.
- Mejora de los sistemas de procesado y envasado de los productos refrigerados de dorada de acuicultura, en los formatos de pescado entero y fileteado. Se estudiarán tecnologías de procesado y envasado ultralimpio para conseguir un aumento significativo de la calidad inicial del producto envasado, y un incremento de la vida útil de cada uno de los productos frescos de la dorada. De la misma manera se estudiarán tecnologías de envasado activo antimicrobiano para conseguir

extender todavía más la vida útil y poder llegar a mercados cada vez más exigentes en calidad y seguridad alimentaria.

Las innovaciones y evaluaciones que se llevarán a cabo en esta tesis siguen los siguientes apartados:

1. Desarrollo de nuevas tecnologías para el envasado de filetes de pescado refrigerados. Descontaminación superficial antes y durante el envasado en atmósfera modificada (MAP) aplicando aceites esenciales (AEs) como agentes antimicrobianos en forma de nanoemulsiones o vapor directo para extender la vida útil y mejorar su seguridad alimentaria.
2. Desarrollo de un hielo antimicrobiano que incluye agentes antimicrobianos naturales encapsulados en β -ciclodextrinas (β -CDs) formando complejos de inclusión, para la conservación de pescado fresco entero y así aumentar su calidad y vida útil.
3. Evaluación de la calidad fisicoquímica, microbiológica y sensorial de la dorada entera conservada en hielo y filetes de dorada envasados en MAP y conservados en refrigeración.
4. Validación a escala piloto e industrial del uso de hielo antimicrobiano desarrollado para la conservación de pescado entero.
5. Caracterización de los complejos de inclusión usados en el hielo antimicrobiano mediante diferentes técnicas: Calorimetría diferencial de barrido (DSC), Espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR), Microscopia electrónica de barrido (SEM) y eficiencia de atrapamiento (EE).
6. Determinación de la migración de los AEs hacia los productos refrigerados de dorada (pescado entero y fileteado).

1.3. ESTRUCTURA DEL DOCUMENTO

La presente memoria se estructura en tres partes diferenciadas que se describen a continuación.

Parte I: comprendida por los Capítulos 1 (Justificación y Objetivos), 2 (Introducción) que recoge la importancia actual del pescado de acuicultura, así como los avances más destacables relacionados con las técnicas de envasado, conservación y seguridad alimentaria de productos frescos y Capítulo 3 (Material y métodos) que describe los materiales y equipos utilizados, así como la metodología seguida para la realización de todos los análisis llevados a cabo.

Parte II: centrada en el estudio de la influencia de la conservación refrigerada y sistemas de envasado y descontaminación superficial de filetes frescos de dorada sobre su calidad y vida útil. En esta parte se incluyen los Capítulos 4, 5 y 6.

Parte III: estudia el desarrollo de un nuevo sistema de envasado en hielo antimicrobiano (hielo que incluye una combinación de aceites esenciales encapsulados en β -CDs) para la conservación de dorada entera y otras especies. Capítulos 7, 8 y 9.

Parte IV: esta última parte del documento corresponde a los Capítulos 10 (Conclusiones) y 11 (Referencias bibliográficas).

Todos los Capítulos de resultados (incluidos en las partes II y III) se presentan en forma de artículo científico comprendiendo los apartados Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión.

CAPÍTULO 2

Introducción

CAPÍTULO 2. Introducción

2.1. ESTADO ACTUAL DE LA ACUICULTURA

2.1.1. Importancia de la acuicultura

La acuicultura es una tecnología de gran interés porque permite responder adecuadamente al aumento de la demanda de productos del mar. Se realiza mediante técnicas encaminadas principalmente a hacer más eficiente la producción de pescado en piscifactorías o granjas acuícolas, aunque cada vez se orienta más a que esta producción sea compatible con un adecuado nivel de bienestar animal de los peces (Ankamah-Yeboah *et al.*, 2019; APROMAR, 2019).

La acuicultura se ha intensificado en estos últimos años debido a que las capturas mundiales de pescado salvaje no han podido cubrir las necesidades actuales de los consumidores. La sobreexplotación y los cambios ambientales han contribuido a este incremento. En este sentido, la acuicultura, al ser un proceso de producción controlado, presenta múltiples ventajas para la industria pesquera ya que ofrece un valor añadido a la sociedad por una producción marina con disponibilidad de existencias según demanda, así como una calidad y seguridad persistente de sus productos debido a las exigentes normas regulatorias adoptadas (Mendes, 2019). De la misma manera, la acuicultura es un sector que ofrece estabilidad y calidad laboral a sus trabajadores, y que puede cumplir adecuadamente con el bienestar animal.

2.1.2. Producción de especies de acuicultura mundial y nacional

La acuicultura de peces es importante tanto en países en desarrollo como en países desarrollados, siendo éstos últimos los que más contribuyen a la acuicultura marina y de interior (agua dulce), especialmente de especies cultivados en aguas frías. La producción de pescado de acuicultura es una técnica que debe ser optimizada tanto a pequeña como a gran escala mejorando el sistema de gestión de las granjas, seleccionando los piensos más adecuados para mantener una buena seguridad alimentaria, y optimizando los sistemas de conservación del pescado (APROMAR, 2019; FAO, 2018b).

A nivel mundial, China encabeza la lista como mayor productor y consumidor de productos de acuicultura a nivel mundial debido a la gran población del país y a su cultura gastronómica, seguida por Indonesia e India. El conjunto de países de la Unión Europea

ocuparía el noveno lugar en la lista, con una producción de 1,3 millones de toneladas, en la cual predominan pescados y moluscos como productos más demandados (APROMAR, 2019).

La producción mundial de acuicultura ha crecido de manera sostenida durante estos últimos años, siendo este aumento de un 3,5% en 2017 respecto del año anterior, con un total de 205,6 millones de toneladas, superando la producción de la actividad pesquera (Figura 2.1). El 87,7% del valor total de la cosecha mundial, para ese mismo año, fue generado por los 10 principales países productores de acuicultura a nivel mundial (China, Indonesia, India, Vietnam, Bangladesh, República de Corea, Filipinas, Egipto, Noruega y Chile), alcanzando los 175,1 millones de euros (APROMAR, 2019).

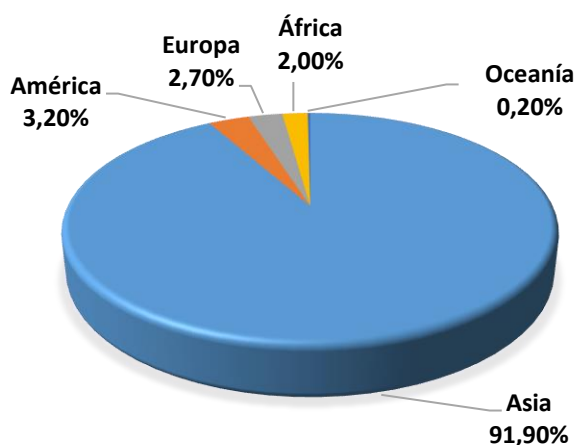


Figura 2.1. Distribución de la producción de acuicultura por los cinco continentes (APROMAR, 2019 y FAO, 2018a).

Debido a la creciente demanda de productos pesqueros en los países de la Unión Europea, la acuicultura tiene una gran repercusión tanto económica como social, ya que esta actividad está en constante proceso de innovación y desarrollo, implementando el modelo de progreso sostenible de todas las empresas dedicadas a este sector. Estas empresas europeas tienen como objetivo principal lidiar con los bajos costes de producción de otros países que son competencia directa y evitar así la importación de productos para el abastecimiento de la población (APROMAR, 2019; FAO, 2018b).

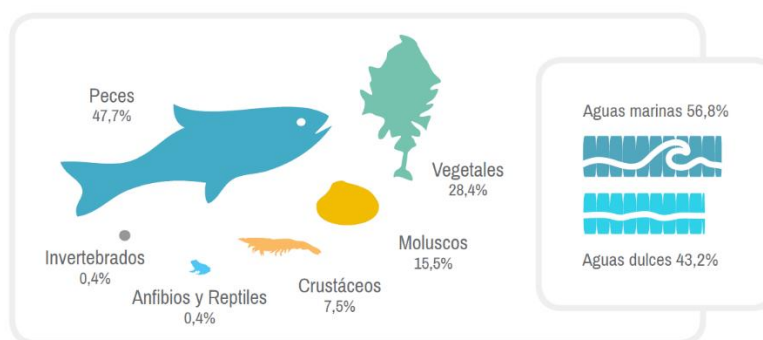


Figura 2.2. Distribución porcentual de la producción de la acuicultura mundial (t) en 2017 por grupos y por entornos de producción (APROMAR, 2019 y FAO, 2018a).

España es el Estado miembro de la Unión Europea con una mayor cosecha de productos de acuicultura y el tercer país productor de peces de acuicultura (Figura 2.3.). Esto es debido a sus idóneas características climatológicas y ambientales para el desarrollo de esta actividad.

La producción de especies de acuicultura en España ascendió en 2017 a 311.032 toneladas (Figura 2.3.), siendo el país con mayor producción de la Unión Europea, de las cuales 66.591 toneladas pertenecen a producción de peces (APROMAR, 2019). Aunque en los últimos años la acuicultura ha experimentado una disminución en algunos países, la cosecha en España sigue en aumento alcanzando 348.395 toneladas en 2018.

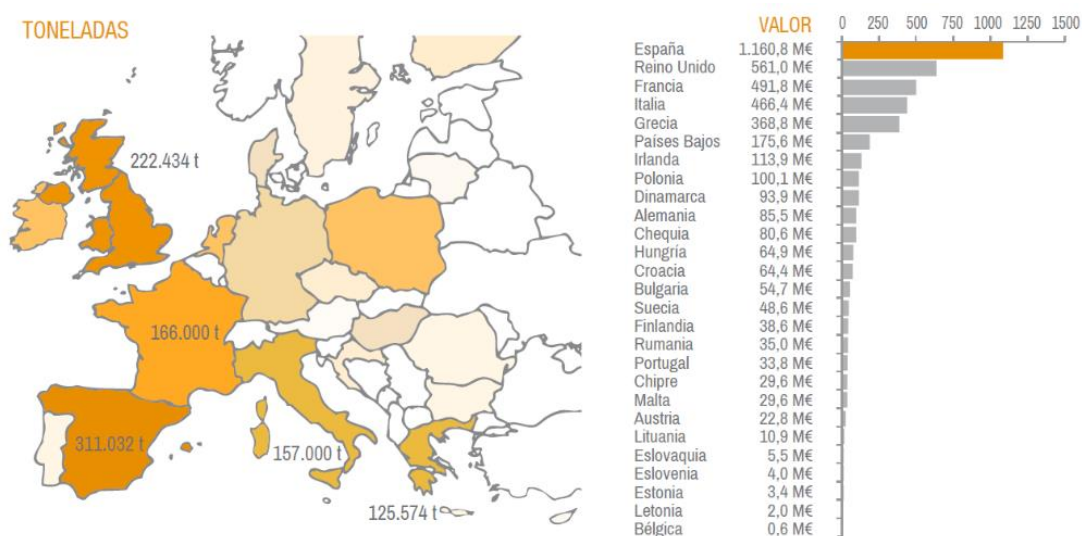


Figura 2.3. Producción de acuicultura (t) en la Unión Europea y su valor (millones de €) en 2017 (FAO, 2018a y APROMAR, 2019).

La principal especie producida en acuicultura en España es el mejillón, seguido por la lubina, la trucha arco iris y la dorada (FAO, 2018b). Cada una de las especies cultivadas

requiere de condiciones específicas que sean las más adecuadas para el crecimiento durante su crianza, como el tipo y temperatura del agua y la alimentación (Tabla 2.1.).

Tabla 2.1. Condiciones de cultivo de las especies más producidas en España (APROMAR, 2019).

ESPECIE	AGUA	ESTABLECIMIENTO		ALIMENTACIÓN
Mejillón 	Marina	Long-lines (estructuras flotantes, cultivos verticales)		Filtración de plancton presente en el agua
Lubina  y Dorada 	Marina	Jaulas marinas (con redes flotantes)		Pienso tipo extrusionado de materias primas naturales
Trucha arco iris 	Dulce	En tierra firme (canales y tanques, en los márgenes de los ríos)		

2.1.3. Consumo de pescado de acuicultura

Los alimentos de origen acuático siguen ganando importancia debido a que se consideran alimentos saludables, especialmente ricos en ácidos grasos poliinsaturados, de gran interés para la salud (Attouchi and Sadok, 2012).

El pescado es uno de los alimentos más comercializados a nivel internacional por ser una fuente vital de proteínas de alta calidad fácilmente digestibles y otros nutrientes como vitaminas (D, A y B) y minerales (calcio, iodo, zinc, hierro y selenio). Por todas estas

importantes características y sumando su bajo contenido graso y su apetecible sabor, así como la valoración de sus propiedades gastronómicas, el pescado se ha convertido en un alimento imprescindible en nuestra dieta (APROMAR, 2019).

El pescado fresco destinado a consumo humano se estipuló en un 88% del total de la producción de pescado en 2016. El aumento del consumo de pescado superó incluso al consumo de carne en ese mismo año debido al incremento en la producción y la reducción del desperdicio de pescado (FAO, 2018a). Este hecho ha sido consecuencia del constante crecimiento de la acuicultura durante los últimos veinte años. En 2018, la Unión Europea realizó un consumo de 13 millones de toneladas de productos de la acuicultura, de los cuales se estimó un consumo de 23,73 kg de pescado por persona y año en los hogares españoles (APROMAR, 2019).

El consumo de productos de acuicultura en la Unión Europea se incrementó un 1,8 % en 2017 con respecto al año anterior. El 87% de los productos de origen acuático fue destinado a consumo humano en 2016 y el resto a alimentación animal.

2.1.4. La acuicultura en la Región de Murcia

La Región de Murcia cuenta con un amplio número de empresas dedicadas a la actividad de la acuicultura. Su producción se centra, principalmente, en peces de acuicultura marina, siendo la comunidad autónoma con mayor producción y cosecha a nivel nacional en este tipo de acuicultura. La Región de Murcia ocupó el segundo puesto en la lista de las comunidades con mayor producción de dorada en España, y el primer puesto, con más del 30 % de la cosecha nacional de lubina en 2018, con respecto a las demás comunidades autónomas de la costa mediterránea (Figura 2.4).

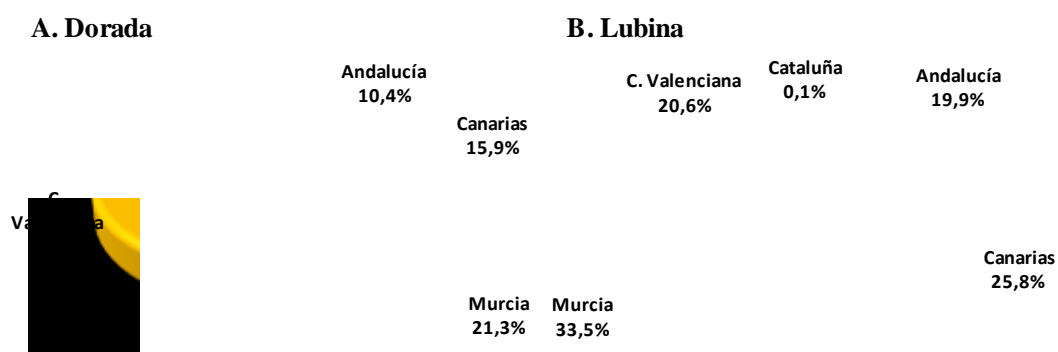


Figura 2.4. Distribución porcentual de las producciones (toneladas) de dorada (A) y lubina (B) en España por Comunidades Autónomas en 2018 (APROMAR, 2019).

Esto implica una importante contribución a la economía regional, así como la generación de un buen número de puestos de trabajo (APROMAR, 2019; FAO, 2018b, 2018a).

2.1.5. Desperdicio de pescado a nivel mundial

El nivel de desperdicio alimentario es un problema de gran interés mundial ya que tiende a ser más alto que la cantidad de alimentos que son finalmente ingeridos. Además, muchos países carecen de la economía necesaria para realizar desarrollos e innovaciones técnicas en sus infraestructuras y servicios, lo que afecta principalmente a la calidad y a la proporción de pescado desperdiciado (FAO, 2018a).

La acuicultura continental es más respetuosa con el medio ambiente que la acuicultura marina, generando normalmente unos niveles más bajos de desperdicio. Aun así, la acuicultura es mucho más eficiente que la pesca tradicional, que, sobre todo en países en vías de desarrollo, posee importantes pérdidas de pescado después de la captura, tanto en la embarcación, como durante el desembarque, transporte, distribución o en el momento de su venta. Así, esas pérdidas, que son debidas sobre todo a una refrigeración insuficiente o no optimizada, pueden dar lugar a unos desperdicios que suponen entre un 27% y un 35% del total de pescado capturado, desde el desembarque hasta la adquisición por el consumidor final (FAO, 2018a). Además, el procesado del pescado fresco genera entre el 30 y el 80% de desperdicios, aunque en algunos casos se pueden aprovechar como subproductos (Zhao *et al.*, 2011; FAO, 2018a).

2.2. CULTIVO DE LA DORADA (*Sparus aurata*)

La dorada (*Sparus aurata*) es una especie marina que se encuentra principalmente en el mar Mediterráneo, y se caracteriza por tener un cuerpo ovalado y aplanado lateralmente, de cabeza con perfil convexo, aleta dorsal espinosa, y presenta una banda dorada entre los ojos, que le da su nombre, y una mancha negra en la zona branquial (Imagen 2.1.) (MAPA, 2020).



Imagen 2.1. Apariencia de la Dorada (*Sparus aurata*) (MAPA, 2020).

Los individuos de esta especie son hermafroditas, pueden vivir más de 10 años y alcanzar hasta 57 cm de longitud. Su tallaje varía entre los 250 g en juveniles hasta los 2000 g en adultos. Nacen en mar abierto, en Otoño, entre los meses de octubre y diciembre y son muy sensibles a las bajas temperaturas, siendo 4 °C su temperatura letal (APROMAR, 2019).

Esta especie despierta un gran interés gastronómico ya que es un pez con alto valor nutricional, semigraso, de buen sabor, buena calidad y alto porcentaje de aprovechamiento (54%). Posee un alto contenido en proteínas (19,9%), es rico en ácidos grasos Omega 3 y Omega 6 y en vitaminas B3 y B12, y su contenido en grasa es sólo del 3,2% (MAPA, 2020).

Su cultivo inicialmente era extensivo. A partir de la década de los 80 comenzaron a aplicarse los sistemas intensivos y durante los 90 se desarrollaron las jaulas en mar abierto, que posteriormente se convertirían en las más utilizadas para la producción de dorada de acuicultura (MAPA, 2020).

Hasta nuestros días, la cría de dorada de acuicultura ha evolucionado con el objetivo de realizar un control más exhaustivo y optimizar las condiciones que afectan a su crecimiento (temperatura, iluminación, pH, dosis y tipo de pienso, etc.) que, a su vez, repercutirán sobre la calidad *postmortem* del pescado. La alimentación en los sistemas intensivos debe ser rica en nutrientes y contar con un suministro constante para que los peces puedan obtener grandes reservas de lípidos (Grigorakis *et al.*, 2002; MAPA, 2020).

Destacan 20 países como productores de dorada, encabezando la lista Turquía (33,6% de la producción total), seguido por Grecia (24,7%), Egipto (14,6%) y España (6%). En 2018, la producción y cosecha de esta especie aumentó un 10,7% y un 9,4% respectivamente, con respecto al año anterior (APROMAR, 2019).

2.3. CULTIVO DE OTRAS ESPECIES DE INTERÉS

2.3.1. Lubina (*Dicentrarchus labrax*)

Esta especie pertenece a la familia *Moronidae* incluida en el orden de los *Perciformes*. La lubina (*Dicentrarchus labrax*) tiene una morfología característica de cuerpo alargado y color plateado, aunque blanco en el vientre (Imagen 2.2.). De boca grande, mancha negra en la zona del opérculo y aletas de diferentes formas geométricas (APROMAR, 2019; MAPA, 2020b).



Imagen 2.2. Apariencia de la especie Lubina (*Dicentrarchus labrax*) (MAPA, 2020b).

Al igual que la dorada es una especie marina eurihalina y euriterma que se encuentra en zonas litorales hasta los 100 metros de profundidad, siendo su temperatura óptima de desarrollo de 20-25 °C. Son carnívoras y se reproducen en diferentes estaciones dependiendo de la zona en la que habiten (invierno en mar mediterráneo y primavera en océano atlántico) llegando a vivir hasta unos 30 años (APROMAR, 2019; MAPA, 2020b).

La producción de lubina se ha intensificado durante estos años debido a la gran demanda de la población por ser un producto de gran calidad organoléptica, alto valor nutricional y gran aprovechamiento (66%) (Provincial *et al.*, 2010; MAPA, 2020). Su cosecha proviene mayoritariamente de la acuicultura (sistema intensivo) en jaulas en el mar. Su tamaño y peso comerciales suelen ser de 40-65 cm y 300-500 g. Los principales países productores son Turquía (38,2%), Grecia (23,1%), Egipto (15,8%) y España (11,4%). El cultivo de lubina de acuicultura en España supone el 96,7 % de la cosecha total (APROMAR, 2019).

2.3.2. Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*)

La trucha arco iris (*Oncorhynchus Mykiss*) pertenece a la orden de los Salmoniformes y familia *Salmonidae*. Tiene un cuerpo alargado y presenta un moteado característico

uniforme sobre los colores tornasolados (azul-verdosos) que adquieren sus escamas (Imagen 2.3.). Es un pescado bastante consumido por ser muy saludable y contar con un alto valor proteico (17,60%) y bajo porcentaje de grasas (2,85) (Celik *et al.*, 2008; Shadman *et al.*, 2017; MAPA, 2020c).



Imagen 2.3. Apariencia de la Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus mykiss*) (MAPA, 2020c).

Esta especie suele habitar en aguas dulces y claras con bajas temperaturas y es bastante resistente a diversidad de ambientes. Su crecimiento es más rápido que el de la trucha común, lo que facilita su cultivo y producción acuícola, alcanzando varios kilogramos de peso como talla comercial (APROMAR, 2019; MAPA, 2020c).

Irán Turquía, Chile, Noruega y Perú son los principales países productores de trucha arco iris a nivel mundial. En España, la cosecha de esta especie aumentó en un 5,1% en 2018 respecto del año anterior (APROMAR, 2019).

2.3.3. Salmón (*Salmo salar*)

Perteneciente a la familia de los *Salmónidos*, el salmón o salmón del atlántico es anádromo, habita la mayor parte de su vida en aguas marinas y migra a aguas dulces para reproducirse (Imagen 2.4.). Su evolución se lleva a cabo siempre a temperaturas frías (4 - 12 °C) como las aguas del norte del Océano Atlántico, Atlántico Oriental, Groenlandia, Islandia y el Círculo Polar Ártico (Ferguson *et al.*, 2007; Garcia De Leaniz *et al.*, 2007).



Imagen 2.4. Apariencia de la especie Salmón (*Salmo salar*).

Su cuerpo es alargado y presenta diferentes aletas dorsal, adiposa, anal y caudal. Su coloración inicial es marrón, pero ésta cambia durante su evolución y en base al tipo de agua en el que habite, los tonos verde-azulados de su cuerpo tornan a grises en aguas dulces. Se caracteriza por el típico color anaranjado de su carne (FAO, 2013; MAPAMA, 2015).

Posee un alto valor nutricional, es un pescado graso rico en ácidos grasos mono y poliinsaturados, proteínas, vitaminas y minerales (fósforo, selenio, yodo y potasio) (MAPAMA, 2015).

El salmón es un pez muy cultivado debido a su gran demanda y alto valor para el comercio mundial. Noruega es el país que encabeza la producción de salmón del atlántico de acuicultura con sistema extensivo y tiene el mayor índice de exportación de esta especie, después de China. Desde el año 2015 hasta el 2017, las exportaciones han aumentado en un 22.3% (FAO, 2018b).

2.4. CARÁCTER PERECEDERO DEL PESCADO: MECANISMOS DE DEGRADACIÓN

En la evaluación de la calidad del pescado, uno de los atributos más importantes que influyen en la aceptabilidad y la parcialidad de los consumidores es la frescura, la cual está directamente relacionada con la apariencia, la textura y el sabor (Cheng *et al.*, 2014; Sharifian *et al.*, 2014).

Durante la manipulación y el almacenamiento, el deterioro de la calidad del pescado fresco se desarrolla con relativa rapidez y limita su vida útil, afectándose significativamente sus características físico-químicas y sensoriales (Mendes, 2019).

El deterioro del pescado se produce como consecuencia de tres tipos principales de degradación: enzimática (autólisis de las células), bacteriana (por el crecimiento de microorganismos de deterioro durante su conservación) y por reacciones oxidativas, tal como se detalla a continuación.

2.4.1. Degradación enzimática

La degradación del pescado fresco a consecuencia de los cambios autolíticos es la primera en producirse tras su captura y muerte y no se relacionan inicialmente con la degradación

microbiológica (Gram and Huss, 1996). Estos cambios relacionados con la pérdida de calidad son causados por enzimas autolíticas endógenas presentes en el músculo del pescado que producen la degradación de los compuestos relacionados con el adenosín trifosfato (ATP) y hacen que los catabolitos estén disponibles para una posible degradación microbiológica posterior. La degradación enzimática es responsable de los primeros cambios sensoriales en el pescado fresco como la pérdida de sabor, alteraciones en el color y cambios en la textura. Todos estos cambios enzimáticos mencionados anteriormente son factores limitantes para la seguridad y vida útil del producto (Ashie *et al.*, 1996; Gram and Huss, 1996; Mendes, 2019).

Algunas enzimas, como lipoxigenasa, peroxidasa y enzimas microsomaes de tejidos animales, pueden desencadenar a su vez la degradación por oxidación lipídica debido al alto contenido de ácidos grasos presente en el pescado (Ashie *et al.*, 1996).

2.4.2. Degradación bacteriana

La degradación bacteriana es el mecanismo de deterioro que más afecta al pescado, como consecuencia de diversos factores del músculo, como una alta actividad de agua, alto pH *post mortem*, presencia de compuestos de bajo peso molecular y/o ausencia de carbohidratos que da lugar al uso, por parte de las bacterias presentes, de sustancias nitrogenadas como el óxido de trimetilamina (TMAO) (Jääskeläinen *et al.*, 2019). El crecimiento bacteriano es el principal responsable de la pérdida de calidad del pescado, por la generación de metabolitos que producen olores y sabores desagradables e inaceptables. El control de este tipo de deterioro es fundamental para conseguir la aceptación del producto por el consumidor final en todo momento (Parlapani *et al.*, 2015).

El nivel microbiológico inicial del pescado fresco depende en gran medida del contenido microbiano del agua en el que viven los peces, ya que podemos encontrar estos microorganismos sobre la superficie externa del pescado fresco (piel y agallas) (Amos, 2007; Ghaly *et al.*, 2010).

Son diferentes tipos de microorganismos los que toman parte en este tipo de deterioro del pescado fresco, y son conocidos como microorganismos específicos del deterioro. Éstos tienen la capacidad de transformar las sustancias nitrogenadas del producto en otros compuestos, es decir, convierten el TMAO en nitrógeno de trimetilamina (TMA-N) obteniendo así compuestos como amonio, aminas, compuestos sulfurados, entre otros.

Entre los microorganismos capaces de realizar estas transformaciones durante la conservación del pescado fresco, y que son los que más intervienen en este proceso de deterioro, se encuentran *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Flavobacterium*, *Shewanella putrefaciens*, *Enterobacteriaceae*, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio* spp. y aerobios mesófilos totales (Amos, 2007; Hassoun and Çoban, 2017). Los niveles de TMA-N resultantes en cada tipo de pescado durante su conservación están relacionados con el deterioro microbiano de los mismos (Ghaly *et al.*, 2010). El crecimiento de estos microorganismos en el producto fresco es determinante para establecer su vida útil (Mikš-Krajnik *et al.*, 2016).

2.4.3. Degradación por oxidación lipídica

El pescado fresco contiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados y por ello es muy susceptible a la degradación del músculo por oxidación lipídica durante su almacenamiento. Este tipo de degradación es una de las causas principales de pérdida de calidad en pescado fresco minimizando así sus propiedades nutritivas, desarrollando olores y sabores típicos de pescado en proceso de deterioro y afectando, a su vez, al color y textura del producto (Hassoun and Emir-Çoban, 2017; Maqsood *et al.*, 2014; Secci and Parisi, 2016).

El proceso de oxidación lipídica en el pescado es bastante complejo. Se diferencian tres partes principales: iniciación, propagación y finalización, y conllevan una serie de reacciones en cadena debido a la formación de radicales libres a partir de los ácidos grasos. Estas fases comienzan mediante la extracción de un átomo de hidrógeno lábil de la cadena de ácidos grasos generando un radical lipídico libre para reaccionar con moléculas de oxígeno y formar radicales peroxilo. Una vez que se produce la acumulación de estos radicales tienen lugar reacciones que generarán productos no radicales, llegando así a la fase de finalización (Ghaly *et al.*, 2010; Hassoun and Emir Çoban, 2017; Xu *et al.*, 2015).

Se han llevado a cabo diferentes estudios para tratar de evitar o disminuir este proceso de degradación del pescado fresco por oxidación lipídica durante su conservación. La mayoría de estos estudios coinciden en paliar este problema oxidativo de pérdida de calidad del pescado fresco mediante la incorporación de agentes antioxidantes sobre el producto. Algunos de estos agentes antioxidantes y antimicrobianos de interés estudiados

en la conservación de pescado son de carácter sintético, como los compuestos fenólicos (Brewer, 2011), y las combinaciones de varios compuestos t-butylhidroquinona, ascorbato y tripolifosfato de sodio (Bakir *et al.*, 1994), o naturales como el uso de bacterias ácido lácticas y sus metabolitos (Ghanbari *et al.*, 2013), tocoferoles (Eymard *et al.*, 2009), extractos de plantas como aceites esenciales (Pezeshk *et al.*, 2015), o la aplicación de recubrimientos comestibles a base de quitosano haciendo de barrera frente a alteraciones oxidativas y microbiológicas (Alishahi and Aider, 2012).

2.5. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN Y ENVASADO DE PESCADO

2.5.1. Refrigeración y congelación

El pescado suele consumirse sobre todo fresco o refrigerado. Aunque esta es la forma más cara de consumo constituye del orden del 45% de la producción total del pescado destinado al consumo humano directo (FAO, 2018a).

Por otro lado, la congelación constituye el principal método de conservación del pescado capturado para consumo humano. Esta tecnología se emplea ampliamente para conservar las propiedades del pescado antes de su consumo o de su procesado industrial (Sharifian *et al.*, 2014). La congelación y ultracongelación son tecnologías de conservación que incluyen el proceso de congelación y el almacenamiento congelado del producto, que utiliza temperaturas de -24 °C a -60 °C. Esta técnica ofrece ventajas logísticas y permite que los alimentos congelados lleguen a mercados lejanos para ser descongelados, o no, al llegar a su destino para su procesado o venta minorista. Las dos variables más importantes a tener en cuenta para mantener la calidad del pescado congelado durante el transporte y conservación son el tiempo y la temperatura, ya que los procesos de deterioro del pescado congelado dependen no solo de la temperatura sino también del tiempo de conservación a esa temperatura (Medina *et al.*, 2009).

Para conseguir resultados óptimos de calidad del pescado, las técnicas de conservación por refrigeración y por congelación se han de complementar con sistemas rápidos de enfriamiento y congelación, como la ultracongelación en alta mar, o el superenfriamiento a bordo de los pesqueros. En este sentido, se han desarrollado sistemas de enfriamiento rápido que utiliza hielo líquido (que es una suspensión de microcristales de hielo de unos

0,5 mm de grosor, en agua), permitiendo un enfriamiento más uniforme y rápido que el que se consigue con hielo triturado (Egolf and Kauffeld, 2005).

Como desventaja de la aplicación de estas tecnologías de enfriamiento rápido podemos citar la generación de costes adicionales para la industria pesquera, pero dichos costes están justificados debido al incremento de valor de los productos que se comercializan (Medina *et al.*, 2009)

Estos dos sistemas de conservación son cada vez más eficientes para reducir las pérdidas de calidad *postmortem* del pescado fresco, tanto en lo que se refiere a calidad sensorial como a calidad nutricional. Sin embargo, aún es posible mejorar las condiciones de conservación del pescado, tal como se detalla a continuación.

2.5.2. Conservación en hielo

La conservación del pescado fresco en hielo es un método ampliamente utilizado para mantener la calidad y alargar su vida útil, debido a su eficiencia de enfriamiento, control de temperatura, retención de humedad, seguridad, disponibilidad y bajo coste (Tavakoli *et al.*, 2018).

Los tipos de hielo más utilizados para la conservación del pescado son el hielo triturado y el hielo en escamas. El hielo triturado y el hielo en escamas son hielos que se fabrican en diferentes tipos de máquinas de hielo, que pueden obtener hielo en “porciones” de distintos tamaños y con forma de escamas o de gránulos irregulares. Independientemente del tipo de hielo utilizado (en escamas o triturado) se han realizado muchos estudios para evaluar el efecto de su uso en la conservación refrigerada de diferentes tipos de pescado.

Simeonidou *et al.* (1997) evaluaron los cambios producidos en la calidad de siete especies de pescado del Mediterráneo conservados en hielo durante una semana. Las especies estudiadas fueron bogue, caballa, jurel, merluza del Mediterráneo, mullet rayado, sardina y caballa del Atlántico. Otros autores como Lakshmanan *et al.* (2002) realizaron un estudio del crecimiento microbiano en pescado y camarón durante 14 días de conservación en hielo. Durante el período de estudio, los recuentos de bacterias gran-negativas fueron los más notables, dando lugar, a su vez, a la producción de aminas y el deterioro de ambos productos.

Mazorra-Manzano *et al.* (2000) y Ocaño-Higuera *et al.* (2009) investigaron la calidad *postmortem* del músculo de *black-skipjack* (*Euthynnus lineatus*) y cazón respectivamente durante su conservación en hielo. Los análisis químicos, microbiológicos y sensoriales establecieron la vida útil para ambos peces en 18 días.

Ocaño-Higuera *et al.* (2011) también estudiaron el efecto de la conservación en hielo sobre la calidad del pez raya durante 18 días, estableciendo su vida útil en 15 días, de acuerdo con los resultados bioquímicos y físico-químicos obtenidos.

El hielo líquido es otra técnica de conservación que se ha estudiado para su uso en pescado fresco. El uso de esta tecnología consigue un enfriamiento más rápido, derivado de su mayor capacidad de intercambio de calor por contacto directo mayor que el hielo triturado, reduciendo además los daños físicos en el producto por sus partículas esféricas microscópicas, en comparación con el hielo en escamas (Egolf and Kauffeld, 2005; Rodriguez *et al.*, 2003). Un estudio de Zakhariya *et al.* (2015) comparó el efecto de dos tratamientos de preenfriamiento previos a la congelación de filetes de barramundi, usando dos tipos de hielo. Los tipos de hielo que se aplicaron fueron hielo líquido y hielo en escamas. Tras el pretratamiento, los filetes se congelaron a -20 °C, y se realizaron análisis físico-químicos y microbiológicos antes de congelar, transcurridas 24 horas tras la congelación, y durante 16 días en congelación. Los filetes pretratados con hielo en escamas obtuvieron mayores valores de nitrógeno básico volátil, mayores recuentos microbiológicos y de pH, una disminución en la dureza y en el contenido de proteínas de los filetes. Los resultados mostraron que tras el pretratamiento con hielo líquido los filetes obtuvieron una mejor calidad y aumentaron su vida útil en comparación con los pretratados con hielo en escamas.

2.5.3. Envasado en atmósfera modificada

El envasado en atmósfera modificada (MAP, de *modified atmosphere packaging*, en inglés) se usa tradicionalmente para preservar la calidad microbiológica y sensorial de los productos frescos, tanto vegetales, como carnes y pescados, mediante el control de su metabolismo bioquímico. Para que el envasado MAP funcione de manera efectiva deben seleccionarse envases (barqueta y film de cierre/sellado) cuyos materiales de fabricación tengan unas propiedades adecuadas de permeabilidad a los gases. El uso de la tecnología de envasado MAP se ha visto incrementado estos últimos años porque es una técnica muy

atractiva para la industria alimentaria. Entre los alimentos del mercado actual que más se han envasado con este sistema MAP se encuentran las frutas y hortalizas mínimamente procesadas, los filetes o troceados de carnes y pescados frescos refrigerados, y las comidas listas para consumir (Han, 2013).

Este sistema de envasado MAP es un método de conservación de alimentos ampliamente utilizado. En combinación con la refrigeración consigue un aumento importante de la vida útil del pescado fresco. El envasado en atmósfera modificada del pescado fresco ha recibido una gran atención debido a los beneficios para la salud del consumo de pescado fresco, junto con su potencial para conseguir un mercado más amplio, y de mercados relativamente más distantes. En esta tecnología MAP, es indispensable establecer la combinación óptima de gases para cada tipo de pescado, junto con un control estricto de la temperatura, ya que son parámetros determinantes de la calidad y vida útil de estos productos frescos refrigerados. En efecto, el aumento de la vida útil específica de los productos refrigerados de pescado, conseguida mediante la tecnología de envasado MAP, depende principalmente de factores como la materia prima (especies, contenido de grasa, carga microbiológica inicial, etc.), la temperatura óptima de conservación en refrigeración, y la combinación de gases más adecuada (para disminuir el crecimiento de microorganismos típicos del deterioro obteniendo un producto seguro durante mayor tiempo), pero, también, se han de tener en cuenta los materiales que se utilizarán para el envasado óptimo del producto (Davies, 2011; Sivertsvik *et al.*, 2002).

Teniendo en cuenta el factor temperatura, la vida útil de los productos de pescado fresco puede oscilar entre 10 y 14 días, a la temperatura comercial de refrigeración de 4 °C, pero se puede aumentar a 18-20 días si se disminuye esa temperatura de conservación hasta 2 °C / -0,9 °C. Las mezclas de gases de mayor interés para el envasado de pescado no graso son 30%:40%:40% (O₂:CO₂:N₂) y 0%:40%:60% (O₂:CO₂:N₂) para pescado ahumado y graso (Robertson, 2009).

Se han realizado numerosos estudios sobre el efecto del envasado MAP en la conservación de filetes de pescado fresco, para favorecer el aumento de su vida útil y mantener su calidad y seguridad iniciales. Boknas *et al.* (2002) llevaron a cabo un estudio de vida útil de filetes de bacalao envasados en MAP, conservados en congelación durante 3, 6, 9 y 12 meses a dos temperaturas diferentes de -20 y -30 °C, y conservados en refrigeración durante 21 días a 2 y 1 °C. Los filetes conservados en refrigeración alcanzaron su límite de vida útil a los 14 días independientemente de la temperatura

seleccionada y los congelados no mostraron diferencias significativas sobre sus atributos de calidad durante los 12 meses de almacenamiento. A su vez, Mejlholm and Dalgaard (2002) estudiaron el envasado de filetes de esta misma especie en MAP con aceite esencial de orégano impregnado en papel de filtro incluido en el envase, evaluando su efecto antimicrobiano y vida útil durante su conservación en refrigeración a 2 °C. Los resultados mostraron que la aplicación del aceite esencial de orégano reduce la carga microbiana y extiende la vida útil de filetes de bacalao de 12 a 26 días.

Goulas and Kontominas (2007) envasaron filetes de dorada ligeramente salados en MAP (30% O₂, 40% CO₂, y 30% N₂) incluyendo aceite esencial de orégano también en papel de filtro, frente a un control, para estudiar su calidad y vida útil durante su conservación en refrigeración a 4 °C. Masniyom *et al.* (2002) evaluaron el efecto del envasado en MAP con alto contenido de CO₂ (80-100%) sobre la vida útil de filetes de lubina. Estos autores concluyeron que estos nuevos sistemas de envasado MAP aplicados sobre filetes de pescado fueron efectivos sobre el mantenimiento de su calidad, y extendieron su límite de aceptabilidad sensorial hasta los 33 días para los filetes de dorada y 21 días para los de lubina, frente a los 15 y 9 días de sus respectivos controles.

Otros autores (Özogul *et al.*, 2004) estudiaron la evolución de la calidad microbiológica, sensorial y química de sardinas envasadas en aire y en MAP con una combinación de gases del 60% CO₂ y 40% N₂, en refrigeración a 4 °C. Obtuvieron que la aplicación de la técnica de envasado MAP extiende la vida útil de las sardinas hasta los 12 días conservadas en refrigeración, frente a los 3 días de las envasadas en aire.

Tassou *et al.* (2016) evaluaron el efecto del envasado MAP (30% O₂, 40% CO₂, y 30% N₂) y en aire sobre la calidad microbiológica de filetes de dorada cubierta con una salsa de aceite de oliva, orégano y zumo de limón, e inoculadas con *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*, conservadas a 0 ± 1°C. Los resultados mostraron un efecto bactericida y bacteriostático debido a la combinación de gases aplicados en el envasado MAP.

2.5.4. Envasado al vacío

El envasado al vacío es una tecnología que se aplica a productos frescos o cocinados que implica la eliminación del aire que queda en el interior del envase antes del sellado

hermético del mismo. El objetivo de esta técnica es la eliminación del oxígeno existente en el envase junto al producto para evitar posibles reacciones de oxidación-enranciamiento que influyan negativamente sobre la calidad del alimento, así como el crecimiento de bacterias aeróbicas y hongos. De esta manera se disminuye el deterioro de la calidad y seguridad del producto y se alarga su vida útil (Han, 2013).

Para realizar el envasado al vacío de alimentos los materiales de envase deben cumplir una serie de requisitos. Dichos materiales deben ser aptos para estar en contacto con el alimento, para que no migren sustancias que arriesguen su seguridad. También deben tener una muy baja permeabilidad a los gases para evitar intercambio de gases que permitan el crecimiento microbiano. Y deben aguantar tanto altas como bajas temperaturas para poder aplicarle tratamientos térmicos y conservarlos en refrigeración o congelación (Nagarajarao, 2016).

La principal ventaja de esta tecnología de conservación de alimentos en refrigeración es evitar la deshidratación y la pérdida de agua por evaporación, además de reducir la oxidación y el crecimiento microbiano (Kaale *et al.*, 2013).

2.5.5. Envasado activo

Los envases activos son sistemas de envasado donde los elementos de envase que lo integran (base del envase, tapa del envase y relleno – ambiente del envase) interactúan con el alimento envasado en su interior, para retardar o inhibir los procesos de deterioro del mismo durante su período de conservación. Por ello, podemos indicar que esta tecnología de envasado normalmente prolongará la vida útil de los alimentos, al mismo tiempo que puede protegerlos frente a microorganismos patógenos (Dini, 2015).

Son diferentes los sistemas de acción de un envase activo. Así, hay envases activos que incorporan eliminadores de O₂, absorbedores o emisores de CO₂, reguladores de humedad, liberadores de agentes antimicrobianos y antioxidantes como los aceites esenciales, y absorbedores o liberadores de compuestos volátiles o aromas (Nagarajarao, 2016).

Los envases activos incluyen normalmente estos agentes antimicrobianos o sustancias físicamente activas en la matriz de sus materiales de envasado durante su proceso de fabricación para que actúen de una forma controlada sobre los productos envasados. De

esta forma se evita que haya artefactos (como bolsitas de agente activo, por ejemplo) dentro del envase, lo cual puede ser indeseable para el consumidor final. Esta solución de envases activos es comercialmente más interesante debido a que son envases más cómodos de usar durante el envasado, y más adecuados para la venta al por menor (Han, 2013).

Estos tipos de envases activos junto a los envases inteligentes contribuyen a mejorar la seguridad y prolongar la vida útil de los alimentos envasados (López-Gómez *et al.*, 2014). Sin embargo, la aplicación de estas tecnologías en el área de productos pesqueros se encuentran en la etapa de desarrollo (Kerry *et al.*, 2006; Nagarajarao, 2016).

2.6. RECIENTES DESARROLLOS EN ENVASADO ACTIVO DE PESCADO

2.6.1. Uso de los aceites esenciales en el envasado activo

Los aceites esenciales (AEs) son sustancias líquidas producidas por diferentes partes de plantas como mecanismos de defensa contra los microorganismos. Estos AEs son sustancias aromáticas de origen natural, con actividades biológicas de amplio espectro y son mezclas altamente complejas, a menudo de cientos de compuestos oleosos volátiles aromáticos individuales, que se extraen de diferentes materiales vegetales, como hojas, cortezas, tallos, raíces, flores y frutas (Barnwal and Sharma, 2005; Calo *et al.*, 2015; Hassoun and Emir Çoban, 2017; Jayasena and Jo, 2013). Los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales determinan su eficacia antimicrobiana en base a su estructura química. Estos compuestos pueden pertenecer a grupos como los aldehídos o fenoles, alcoholes terpénicos, cetonas o ésteres, siendo los más efectivos contra los microorganismos de alimentos los citados en primer lugar (como es el caso del carvacrol, eugenol, timol, limoneno, citral, etc) (Perricone *et al.*, 2015).

En los últimos años, la industria alimentaria ha demostrado un gran interés y una creciente demanda de estos compuestos naturales para desarrollar nuevos aditivos alimentarios que sustituyan los conservantes de origen químico. Estos compuestos naturales son aplicados en alimentos dado su efecto contra el deterioro de su calidad y el crecimiento de microorganismos alterantes patógenos (Asbahani *et al.*, 2015; Tongnuanchan and Benjakul, 2014).

Los agentes antimicrobianos que se incluyen en el envase de alimentos prolongan la fase de latencia o adaptación y reducen la fase de crecimiento de los microorganismos, consiguiendo así extender la vida útil y mantener mejor la calidad y seguridad de los productos (Han, 2013). Los materiales de envasado con antimicrobianos normalmente deben estar en contacto directo con la superficie del alimento sólido, ya que suelen inmovilizarse en la superficie del material para migrar hacia el alimento. Por lo tanto, el envase activo antimicrobiano es efectivo normalmente en esos alimentos sólidos donde la contaminación microbiana ocurre en la superficie (Appendini and Hotchkiss, 2002).

El uso de estos agentes naturales antimicrobianos para la conservación refrigerada de pescado fresco y filetes frescos de pescado ha sido estudiado por diversos autores con las técnicas de aplicación que a continuación se detallan.

2.6.1.1. Aplicación directa en estado vapor

El tratamiento con vapor de aceites esenciales en combinación con la refrigeración ha demostrado ser un método de conservación efectivo para la prolongación de la vida útil de los alimentos sólidos frescos (Ramos *et al.*, 2014) debido sobre todo a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Patel, 2015).

Cai *et al.* (2015) estudiaron el efecto de varios aceites esenciales (de clavo, comino y hierbabuena) sobre la conservación refrigerada de filetes de tambor rojo (*Sciaenops ocellatus*). En su estudio comprobaron que la aplicación directa del aceite esencial de hierbabuena sobre los filetes, a una concentración de 4 $\mu\text{L/L}$ aire durante 2 horas y a 10 °C, fue un tratamiento efectivo para mejorar la calidad y extender la vida útil de los filetes de tambor rojo conservados en refrigeración. Se mantuvieron mejor los parámetros de calidad sensorial y firmeza, se formó un bajo contenido en aminas, y se produjo una inhibición microbiológica y un retraso del deterioro con respecto al tratamiento sin aplicación de vapor de aceites esenciales.

Corbo *et al.* (2008) estudiaron el efecto de diferentes combinaciones de aceites esenciales de timol, extracto de semilla de pomelo y extracto de limón sobre la conservación en refrigeración (5 °C) de hamburguesas de pescado en envases de plástico. El producto fue inoculado con microorganismos típicos del deterioro del pescado (*Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium phosphoreum* y *Shewanella putrefaciens*) y se aplicaron

sobre el mismo estos agentes naturales para comprobar su efecto. Los resultados de este estudio mostraron un retraso en el deterioro del producto manteniendo su calidad sensorial, así como un efecto positivo retardando el crecimiento microbiano con respecto a las muestras control.

Otra forma de aplicación de aceites esenciales en forma de vapor es la llevada a cabo por López-Gómez *et al.* (2019). Estos autores realizaron ensayos de aplicación de aceites esenciales (combinación de Carvacrol:Hierbabuena, ratio 80:20) sobre cilantro fresco bajo condiciones de vacío (en el equipo *vacuum cooling*), tanto a escala planta piloto como escala industrial. El efecto obtenido con esta técnica fue positivo extendiendo la vida útil del producto hasta en 12 días en refrigeración, manteniendo mucho mejor su calidad microbiológica y sensorial que el control sin tratamiento. Esta técnica es de interés industrial ya que se reduce la dosis de aceite esencial aplicado y con ello los costes derivados, además de asegurar una buena seguridad alimentaria del producto tratado.

2.6.1.2. Nanoemulsión

El término "nanoemulsión" se refiere a una dispersión isotrópica transparente casi estable termodinámicamente de dos líquidos inmiscibles, como el aceite y el agua, estabilizada por una película interfacial de moléculas de surfactante (Thakur *et al.*, 2013). Las nanoemulsiones son consideradas como antimicrobianos autoconservadores debido al hecho de que el agua presente en ellos está efectivamente unida por su estructura y limita el acceso a microorganismos alterantes (Al-Adham *et al.*, 2000). Así, un estudio llevado a cabo por Özogul *et al.* (2016) evaluó el efecto de la nanoemulsión a base de diferentes aceites sobre la calidad físicoquímica y sensorial de filetes de lubina conservada en refrigeración a 2 ± 2 °C. Los aceites seleccionados fueron de girasol, colza, maíz, oliva, soja y avellana. Tras el período de conservación concluyeron que las muestras tratadas con nanoemulsión extendían su vida útil hasta los 10 días, mientras se quedaba en 8 días el control.

La formación y estabilidad de las nanoemulsiones depende en gran medida de la naturaleza física de la fase oleosa y de la fase acuosa utilizadas. Las características más ventajosas de las nanoemulsiones para ser aplicadas en diferentes sectores de la industria (cosmética, farmacéutica o alimentaria) son una alta estabilidad física, alta biodisponibilidad y baja turbidez (Ghosh *et al.*, 2013).

El uso más destacado de las nanoemulsiones en la industria alimentaria es su aplicación como una técnica de descontaminación de alimentos mediante la incorporación de aceites esenciales como agentes antimicrobianos. La incorporación de aceites esenciales a las nanoemulsiones contribuye a incrementar su efecto antimicrobiano reduciendo la proliferación de microorganismos y, a su vez, se enmascaran los aspectos negativos de los aceites, como fuertes olores o sabores, que pueden afectar a las propiedades sensoriales de los alimentos sólidos sobre los que se aplican (Donsì and Ferrari, 2016).

Autores como Ozogul *et al.* (2017) mostraron que las nanoemulsiones a base de aceites esenciales de romero, laurel, tomillo y sabia son efectivas para reducir la tasa de crecimiento bacteriano y los valores de los parámetros bioquímicos de los filetes de trucha arco iris durante el almacenamiento en hielo. Shadman *et al.* (2017) trabajaron también con filetes de trucha arcoíris y evaluaron el efecto de una nanoemulsión a base de aceite de girasol con aceite esencial de *Zataria multiflora* Boiss (a diferentes concentraciones) sobre su calidad, durante su conservación en refrigeración a 4 ± 1 °C. Los resultados obtenidos mostraron que la nanoemulsión en combinación con aceites esenciales contribuyó a incrementar sus propiedades sensoriales y de textura, así como la inhibición en el deterioro por oxidación lipídica.

Todos los autores que han evaluado la efectividad de nanoemulsiones de AEs sobre productos frescos recomiendan su uso como conservante eficiente para filetes refrigerados de pescado, ya que dicho recubrimiento forma una barrera que dificulta la entrada a microorganismos alterantes retardando así el deterioro del producto. El efecto de las nanoemulsiones se ha evaluado también frente a patógenos inoculados en alimentos líquidos obteniendo reducciones de más de un 90%. Ros-Chumillas *et al.* (2017) y Maté *et al.* (2017) llevaron a cabo estudios aplicando una nanoemulsión a base de D-limoneno (componente principal de los AEs de cítricos) sobre soluciones líquidas inoculadas con *Salmonella* Senftenberg y *Listeria monocytogenes*, respectivamente, junto con un tratamiento térmico. La resistencia térmica de *Salmonella* Senftenberg se consiguió reducir 50 veces, y 90 veces en *Listeria monocytogenes*, cuando se le aplica la nanoemulsión.

2.6.1.3. Encapsulados en el material de envasado

Los aceites esenciales son muy utilizados en la industria alimentaria como aromas, pero también por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, pero son muy volátiles y tienen un carácter hidrofóbico que los hace inmiscibles en soluciones acuosas y dificulta su aplicación (Burt, 2004).

Por ello, una alternativa para facilitar la aplicación de estos AEs y aumentar su solubilidad y disolución es la encapsulación en ciclodextrinas (CDs) mediante la formación de un complejo de inclusión (Kamimura *et al.*, 2014).

Las CDs son oligosacáridos cíclicos derivados del almidón debido a una reacción enzimática simple, que forman una estructura cristalina. Los derivados del almidón son completamente seguros para incluirlos como aditivos en alimentos para el consumo humano, ya que están reconocidos como sustancias seguras (GRAS), no tóxicas y se metabolizan por completo en el organismo (European Medicines Agency, 2017).

Las CDs se dividen en tres tipos principales: α , β y γ -CDs (Figura 2.5.), que se diferencian por tener seis, siete y ocho unidades de D-(+) glucopiranosas unidas por enlaces α (1 \rightarrow 4) glucosídicos, respectivamente, que determinan el diámetro interno de la cavidad y su volumen, aunque la altura de su pared es la misma (Marques, 2010). Según el tipo de molécula que se desee encapsular se deberá seleccionar la ciclodextrina más adecuada, en base a las dimensiones de su cavidad interna. Las α -CDs son más eficientes albergando sustancias de bajo peso molecular, mientras que las β -CD son las más comúnmente utilizadas en la industria cosmética, farmacéutica y alimentaria por ser las más eficientes formando complejos de inclusión con compuestos aromáticos, como los AEs. En cambio, las γ -CDs se caracterizan por tener mayor tamaño y poder albergar moléculas de mayor peso molecular (Del Valle, 2004).

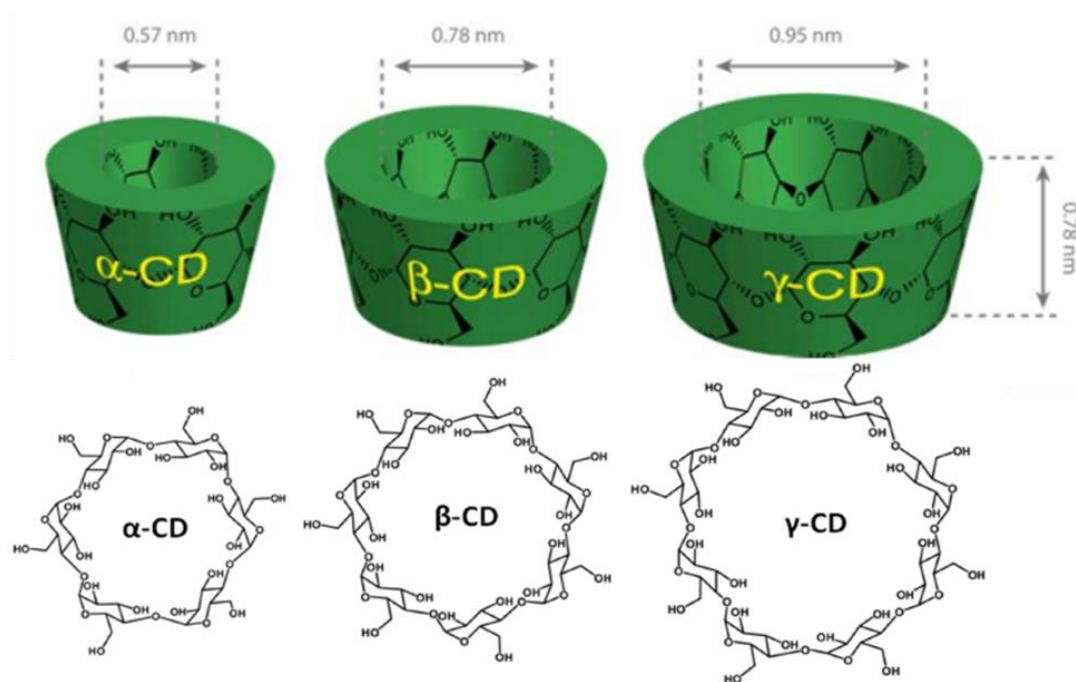


Figura 2.5. Estructura molecular y dimensiones geométricas de las diferentes ciclodextrinas: α -CD, β -CD y γ -CD (Modificado de Crini, 2014).

La característica destacable que las hace tan interesantes para formar complejos de inclusión en estado sólido (Figura 2.6) es tener una estructura troncocónica cuya cavidad interna es hidrofóbica, en la que se puede albergar otras moléculas huésped, y su pared externa es hidrofílica, lo que favorece la liberación gradual de las moléculas encapsuladas en contacto con soluciones acuosas o en ambientes con alta humedad relativa. A su vez, la encapsulación de AEs en CDs es un proceso simple y de bajo coste siendo una ventaja frente a otros tipos de encapsulación (Del Valle, 2004).

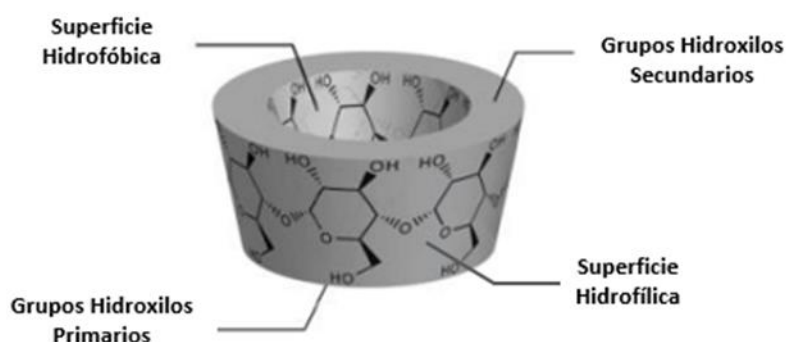


Figura 2.6. Esquema de la estructura funcional de las CDs (Crini, 2014).

La formación del complejo de inclusión depende principalmente de la polaridad y pesos moleculares de las ciclodextrinas y del sustrato huésped. Ambas moléculas combinadas deben alcanzar un equilibrio y estabilidad para que la fuerza de unión de la inclusión sea

efectiva. Las CDs posibilitan la inclusión de sustancias hidrofóbicas en estado líquido, como los aceites esenciales, transformando sus propiedades fisicoquímicas y formando estructuras cristalinas sólidas estables que disminuyen su volatilidad y aumentan tanto su solubilidad como su efecto antimicrobiano (Abarca *et al.*, 2016; Ponce Cevallos *et al.*, 2010). Por otro lado, los complejos de inclusión ofrecen la ventaja de disminuir o eliminar aspectos negativos de las moléculas huésped, como aromas o sabores extraños, que puedan afectar organolépticamente a alimentos en los que se desean añadir como aditivos (Marques, 2010).

Los aceites esenciales encapsulados en CDs pueden ser integrados en los materiales de envasado de los alimentos, ya sea plástico, cartón, etc. Estos agentes antimicrobianos le proporcionan al envase un carácter activo debido a su liberación gradual durante el período de almacenamiento del envase en condiciones de refrigeración y alta humedad relativa (European Commission, 2009; Ramos *et al.*, 2014).

Se han llevado a cabo estudios siguiendo esta técnica de envasado activo con agentes antimicrobianos naturales encapsulados en CDs evaluando su efecto sobre alimentos frescos. Buendía-Moreno *et al.* (2019a; 2019b; 2020) realizaron ensayos de envasado de tomate cherry y tomate (variedad caniles) en cartón incluyendo aceites esenciales encapsulados en CDs como envase activo y evaluaron su efecto sobre la calidad físicoquímica, microbiológica y sensorial, así como la vida útil de los mismos. En dichos ensayos se observó una reducción sobre el deterioro del producto envasado durante su período de conservación en refrigeración. La liberación gradual de los aceites esenciales encapsulados mantuvo en buenas condiciones las características sensoriales de los tomates durante más tiempo, aumentando así su vida útil con respecto a los tratamientos control.

2.6.1.4. Películas comestibles “Edible Coatings”

El uso de películas y recubrimientos comestibles es una variante del envasado activo de alimentos, ya que la comestibilidad y la biodegradabilidad de las películas son funciones adicionales que no están presentes en los sistemas de envasado activo convencionales (Han, 2002; Han, 2013). Por ello se reconocen como una alternativa válida y efectiva a otros tipos de envasado de alimentos frescos para preservar su calidad, extender su vida útil y mejorar la seguridad alimentaria (Peretto *et al.*, 2014).

Las películas y recubrimientos comestibles son materiales útiles producidos principalmente a partir de compuestos naturales biodegradables como biopolímeros comestibles (lípidos, polisacáridos y proteínas) y aditivos de calidad alimentaria (Han, 2013). A su vez, son capaces de retrasar los cambios físico-químicos que se puedan producir durante la conservación (Peretto *et al.*, 2014).

Se han llevado a cabo diversos estudios incluyendo aceites esenciales en estas películas comestibles para enmascarar las posibles alteraciones sensoriales que pueden generar los mismos si se aplican de forma directa sobre el producto. Estos AEs se aplican para obtener un efecto antimicrobiano y antioxidante sinérgico frente a posibles ataques por microorganismos patógenos, siendo este efecto variable en función de la cantidad de aceite esencial incorporado en el recubrimiento comestible (Coma, 2008; Tongnuanchan and Benjakul, 2014).

Gómez-Estaca *et al.* (2010) llevaron a cabo estudios de aplicación de películas biodegradables a base de gelatina-quitosano que incorporaban aceite esencial de clavo para la conservación de filetes de bacalao. Wu *et al.* (2014) realizaron un estudio en músculo de carpa con un recubrimiento de quitosano al 4% y con aceite esencial de orégano incluido. Ojagh *et al.* (2010) y Volpe *et al.* (2015) estudiaron el efecto de un recubrimiento activo a base de quitosano enriquecido con aceite esencial de canela, y de compuestos bioactivos de carragenina incluyendo aceite esencial de limón, respectivamente, sobre la calidad y vida útil de filetes de trucha arcoíris. Todos los estudios anteriores mantuvieron sus productos en refrigeración durante su período de conservación, y obtuvieron resultados positivos respecto del control en cuanto a extensión de la vida útil y cierto control de la proliferación microbiana.

2.6.2. Técnicas combinadas de envasado

La aplicación de las diferentes técnicas más habituales de conservación de alimentos refrigerados, en combinación con otras tecnologías, o incluyendo agentes naturales como antioxidantes y antimicrobianos, pretende desarrollar un efecto sinérgico para aumentar la vida útil de esos alimentos envasados.

A continuación, se analizan algunas de las técnicas más efectivas para la conservación de pescado fresco, que incluyen el uso de aceites esenciales en el envasado.

2.6.2.1. Hielo antimicrobiano (con aceites esenciales)

El uso de hielo con antimicrobianos se ha propuesto como un método de conservación de productos frescos como el pescado, incorporando sustancias antimicrobianas naturales o no en el hielo. Los aceites esenciales se pueden utilizar adicionándolos al hielo para conseguir, además de los efectos de conservación del hielo (mantenimiento de una temperatura y HR adecuada de conservación), otros efectos antimicrobianos y antioxidantes. El mecanismo de acción de este tipo de hielo antimicrobiano en contacto con el pescado fresco consiste en que los AEs se liberan gradualmente del hielo volatilizándose, actuando sobre la superficie del pescado, y evitando el crecimiento microbiano y de patógenos en la superficie del pescado fresco envasado en hielo. Varios estudios han comprobado que este hielo de conservación reduce el crecimiento microbiano en el pescado fresco, lo que prolonga su vida útil y aumenta su seguridad. Así, Tavakoli *et al.* (2018) estudiaron el efecto del aceite esencial de reshgak incluido en el hielo de conservación de trucha arcoíris entera. Se realizaron análisis físico-químicos, microbiológicos y sensoriales durante 20 días de conservación. Los resultados obtenidos de todos los parámetros evaluados demostraron que el sistema de conservación en hielo incluyendo aceite esencial de *Reshgak* (*Ducrosia anethifolia* Bioss, una hierba bianual iraní de la familia *Apiaceae*) fue efectivo para la conservación de trucha arcoíris prolongando su vida útil en 8 días con respecto al hielo sin aditivo.

Bensid *et al.* (2014) evaluaron el efecto de la conservación de anchoa entera en hielo con aceites esenciales incluidos sobre sus parámetros de calidad y vida útil. Los aceites esenciales probados fueron los de tomillo, orégano y clavo, y se realizaron análisis químicos, microbiológicos y sensoriales durante su conservación. Este estudio demostró que la conservación de anchoa con hielo incluyendo aceites esenciales mejora su calidad, obteniendo una disminución en los valores del nitrógeno básico volátil y ácido tiobarbitúrico, y prolonga su vida útil en 12 días con respecto a la conservación con hielo normal, que alcanzó 9 días.

En todos estos casos, el hielo presenta un olor fuerte debido a los aceites esenciales añadidos directamente al hielo o al agua de fabricación del hielo, y las dosis de AEs utilizadas era relativamente elevadas, por lo que el gusto podía cambiar en el pescado fresco.

2.6.2.2. Envasado en atmósfera modificada aplicando aceites esenciales

Como hemos visto anteriormente, el sistema de envasado MAP favorece la conservación de alimentos sólidos refrigerados, mejorando su calidad y vida útil sin alterar, en general, sus propiedades nutritivas ni organolépticas. Pero, esta técnica de envasado se puede implementar en combinación con agentes naturales antimicrobianos y antioxidantes, como son los aceites esenciales, mejorando así su efecto de conservación sobre los productos envasados en MAP.

En efecto, se han llevado a cabo diferentes estudios donde se combina el sistema de envasado MAP con la aplicación de aceites esenciales en diversos alimentos sólidos refrigerados. Chouliara *et al.* (2007) estudiaron el efecto de la conservación en refrigeración a 4 °C de carne de pollo, envasada en MAP y en combinación con aceite esencial de orégano, sobre su calidad y vida útil. Este sistema combinado de envasado prolongó la vida útil de la carne de pollo en 5-6 días manteniendo sus propiedades sensoriales no alteradas, en principio, por el uso de los AEs.

Con respecto a la conservación refrigerada de filetes de pescado se ha estudiado el efecto del uso del envasado MAP en combinación con diferentes aceites esenciales (orégano, canela, albahaca, laurel, clavo, mejorana, hoja de limón, salvia y tomillo) sobre la inhibición de *Photobacterium phosphoreum* inoculada en filetes de bacalao. El aceite esencial que mejor resultado obtuvo fue el aceite de orégano aplicado al 0,05 % v/p (aceite esencial/peso de filetes en el envase, aplicado directamente sobre el producto) mostrando una inhibición del crecimiento microbiano de *P. phosphoreum* y aumentando la vida útil de los filetes hasta los 21-26 días conservados en refrigeración a 2 °C (Mejlholm y Dalgaard, 2002).

Otros autores estudiaron el efecto combinado del envasado MAP con la incorporación de una combinación de aceites esenciales de timol, extracto de limón y semilla de pomelo sobre la calidad de hamburguesas de pescado azul (caballa y merluza) durante 28 días en refrigeración a 4 °C. Los resultados obtenidos de su análisis nutricional, microbiológico y sensorial muestran que se mantiene la calidad microbiológica hasta el final de su período de conservación, pero no así en los tratamientos sin estos AEs. No obstante, la vida útil de las hamburguesas de pescado se limitaba a 22-23 días debido a la alteración de sus propiedades sensoriales (Del Nobile *et al.*, 2009).

Kostaki *et al.* (2009) evaluaron el sistema de envasado MAP en combinación con aceite esencial de tomillo en filetes de lubina refrigerados. La calidad sensorial de los filetes de lubina mostró una mejora significativa, aumentando su vida útil hasta los 17 días en comparación con los 6 días que se conseguían en las muestras control.

Otro estudio aplicó la combinación del envasado MAP con aceite esencial de canela al 1% (p/p) en la conservación de magra de cerdo y filetes de salmón frescos. Los resultados obtenidos fueron positivos en la conservación de carne de cerdo retrasando el crecimiento microbiano y la generación de malos olores, pero negativo para los filetes de salmón que no consiguieron alargar su vida útil con respecto a las muestras control, envasadas en aire (Van Haute *et al.*, 2017).

En todos estos casos, la adición de los AEs se hacía directamente en forma líquida sobre el producto envasado, lo que podía alterar negativamente la calidad sensorial del mismo.

2.6.2.3. Envasado al vacío incluyendo aceites esenciales

El tratamiento de las muestras con agentes naturales antimicrobianos junto al sistema de envasado al vacío es una tecnología emergente que ha sido bastante utilizada para la conservación de productos frescos o cocinados. Atrea *et al.* (2009) evaluaron el efecto del envasado a vacío combinado con la aplicación de aceite esencial de orégano (aplicado en una proporción de 0,2 y 0,4 % en peso) sobre la vida útil de pulpo del mediterráneo conservado en refrigeración a 4 °C durante 23 días. En los resultados obtenidos observaron bajos niveles de nitrógeno de trimetilamina y nitrógeno básico volátil en las muestras tratadas con aceite de orégano. A su vez, se alargó la vida útil de las muestras tratadas hasta 11 y 20 días, en función de los análisis sensoriales y la dosis aplicada.

Otros autores realizaron un estudio similar combinando la tecnología de envasado a vacío con la aplicación de aceite esencial de romero (aplicado al 0,4 y 0,8 % en peso) sobre la calidad de hamburguesas de caballa conservadas en refrigeración a 4 °C. Concluyeron que el aceite esencial de romero junto con el envasado al vacío fue eficaz para controlar el crecimiento microbiológico y los parámetros bioquímicos como el ácido tiobarbitúrico, el valor de peróxido y los ácidos grasos libres, que mostraron valores más altos para el tratamiento control (Uçak *et al.*, 2011).

Un estudio de Erkan y Bilen (2010) evaluó la calidad y la vida útil de filetes de trucha arcoíris ahumada, tratada con aceite esencial de tomillo y ajo, y envasados al vacío, y conservados en refrigeración a 2 °C. Los análisis realizados (microbiológico, bioquímico y sensorial) mostraron resultados favorables para los filetes tratados con aceite de tomillo y aceite de ajo, prolongando su vida útil hasta las 7 semanas en comparación con las 5 semanas del tratamiento control.

Por otro lado, y con el mismo producto, filetes de trucha arcoíris, Frangos *et al.* (2010) realizaron varios tratamientos de envasado en aire y vacío, adicionando sal y aceite esencial de orégano al 0,2 y 0,4 % (en peso). Para los análisis microbiológico y bioquímico realizados, los tratamientos que mayor efecto obtuvieron fueron los de envasado al vacío adicionando sal y aceite esencial de orégano al 0,2 %. Con respecto al análisis sensorial, los mismos tratamientos anteriores (sal + vacío y sal + orégano 0,2 % + vacío) fueron los mejor evaluados por los panelistas prolongando la vida útil de los filetes de trucha en 9 y 12 días respectivamente, respecto del control.

De esta forma, se puede afirmar que la aplicación de esta tecnología de envasado al vacío combinada con la aplicación directa de AEs en forma líquida, en el envasado de productos de pescado refrigerados, es efectiva manteniendo su calidad y aumentando su vida útil, pero puede tener efectos negativos desde el punto de vista sensorial al añadir directamente los AEs en forma líquida y en unas dosis relativamente elevadas.

CAPÍTULO 3

Materiales y Métodos

CAPITULO 3. Materiales y métodos

3.1. MATERIAL UTILIZADO

El pescado que se ha utilizado en la mayoría de los experimentos realizados en esta tesis ha sido de la especie dorada (*Sparus aurata*) de acuicultura (Imagen 3.1.), aunque también se ha utilizado salmón, trucha y lubina (ver capítulos 2 y 9).



Imagen 3.1. Detalle de la dorada entera y fileteada utilizada en los ensayos realizados en esta tesis.

Las doradas fueron cultivadas en la costa mediterránea por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo S.L. (SAM), del grupo al que pertenece Pescados de Acuicultura de Murcia S.L. (PESCAMUR), y CUBIPLAYA S.L., todas ellas ubicadas en San Pedro del Pinatar (Región de Murcia, España).

Los ejemplares de dorada utilizados para los experimentos tenían un tamaño medio de unos 30 cm de longitud y un peso de 400 ± 100 g, siendo alimentados con pienso comercial y capturados en el mismo día de inicio de cada experimento. La captura de las doradas en piscifactoría se realizaba con un salabre de unos 250 kg de capacidad, para descargarlas a continuación en menos de 20 s en cubas de 1000 L de capacidad cargadas con agua y hielo (para conseguir un ratio en peso de 1:1:1, de agua de mar: hielo: pescado), situadas en la cubierta del barco de captura. Las doradas eran sacrificadas por hipotermia, debido a la reducción de la temperatura por contacto con el agua y el hielo a una temperatura de 1 ± 1 °C.

Las muestras necesarias para cada ensayo fueron clasificadas y envasadas en cajas de poliestireno con hielo a su llegada a tierra, en las instalaciones de la empresa

PESCAMUR. Después, se llevaban a las cámaras frigoríficas de los laboratorios del Área de Tecnología de Alimentos de la UPCT para su conservación, en espera del fileteado y envasado posterior, o para llevar a cabo a continuación los ensayos de conservación de pescado entero. Las muestras de pescado entero o fileteado envasado se analizaron al inicio y en diferentes días durante su período de conservación en hielo y/o refrigeración, para determinar la evolución de la calidad medida mediante distintos parámetros microbiológicos, físico-químicos y sensoriales.

3.2. TECNOLOGÍAS APLICADAS DE DESCONTAMINACIÓN Y ENVASADO DE PESCADO FILETEADO

3.2.1. Condiciones de fileteado y envasado de la dorada

Los ensayos de procesado (fileteado) y envasado ultralimpio se realizaron en una sala blanca Clase 10.000 (según la norma FS 209 E) ubicada en la citada Planta Piloto. Esta sala blanca está equipada con una cabina de flujo laminar de clase 100 donde se llevó a cabo el fileteado de las doradas (eviscerado, y obtención de los filetes) y su colocación dentro de los envases / barquetas de polipropileno (Imagen 3.2.). Durante el fileteado y envasado de los filetes, la sala blanca se mantuvo refrigerada a una temperatura de 8 °C.

Todas las superficies de trabajo y utensilios necesarios para el procesado y envasado en condiciones ultralimpias (tablas de cortar, cuchillos y todo el material de trabajo en contacto con las doradas) fueron esterilizados previamente con una solución desinfectante para garantizar la máxima esterilidad. A su vez, todos los utensilios quedaron expuestos en la cabina de flujo laminar de clase 100 bajo radiación ultravioleta para garantizar la esterilización de los mismos.



Imagen 3.2. Interior de sala blanca clase 10000 utilizada en el fileteado y envasado ultralimpio, dotada de cabina de flujo laminar clase 100 (izda de la foto) y termoselladora con atmósfera modificada y dotada de equipo de evaporación y aplicación de AEs al producto envasado (fondo de la sala).

3.2.2. Envasado en atmósfera modificada (MAP)

Para el envasado en MAP los filetes fueron introducidos en barquetas de polipropileno con un volumen de 750 mL y se termosellaron en una termoselladora Efaman (Efabin, Murcia) ubicada en la citada sala blanca donde se realizaba el fileteado en condiciones ultralimpias (Imágenes 3.2. y 3.3.).

La termoselladora está equipada con un formato de 4 barquetas por ciclo de termosellado (Imagen 3.3. Dcha.). Todas las barquetas con dorada fileteada se termosellaron con atmósfera modificada (MAP), usando una combinación de gases de 60 % CO₂ – 40% N₂. El cierre de las barquetas se ha realizado con film Cryovac® EOP616B (fabricado a partir de un sustrato de película de poliéster y una barrera coextruida de 5 capas a base de polietileno, EVOH y polipropileno para el termosellado; y con un grosor de 39 µm). Este film tiene una permeancia al O₂ de 7,00 cm³/(m².día.atm), al N₂ de 0,50 cm³/(m².día.atm), y al CO₂ de 25,00 cm³/(m².día.atm), y una velocidad de transmisión del vapor de agua de 10,00 g / (m². día). Este film es especialmente recomendado por el fabricante para el envasado de pescado.

Una vez terminado el proceso de envasado en MAP de los filetes, todos los envases se almacenaban en cámara frigorífica a la temperatura más adecuada en función del ensayo realizado, muestrándose en cada momento de su análisis.

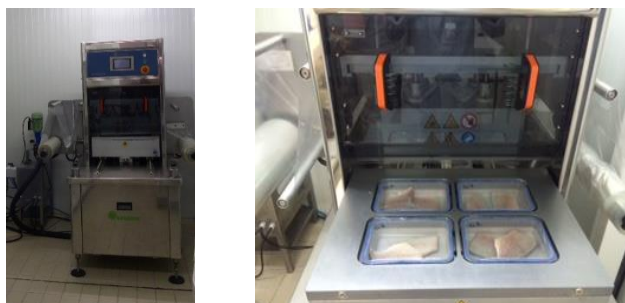


Imagen 3.3. Equipo de termosellado y aplicación de atmósfera modificada (envasado MAP) modelo Efaman (Efabin, Murcia).

3.2.3. Descontaminación mediante baño por inmersión en nanoemulsión de aceite esencial de orégano

La descontaminación de la dorada entera y los filetes de dorada en baño de nanoemulsión de aceite esencial de orégano (AEO) al 0,1% se llevó a cabo mediante inmersión durante 2 minutos y a una temperatura de 4 °C. Transcurrido ese tiempo, se realizó el escurrido en una centrifugadora manual durante 30 s (Imagen 3.4.). Posteriormente, fueron introducidos los filetes en barquetas de polipropileno que eran termoselladas en MAP tal como se ha indicado anteriormente.



Imagen 3.4. Detalle de la descontaminación de filetes de dorada con nanoemulsión de AEO.

3.2.4. Descontaminación mediante la aplicación de vapores de aceites esenciales en el envasado MAP, envasado activo

La aplicación de vapores de aceites esenciales como técnica de descontaminación de filetes de dorada se ha llevado a cabo en el equipo de termosellado modelo Efaman descrito anteriormente. Esta termoselladora puede realizar la inyección de gases de la atmósfera modificada deseada, pero también puede inyectar en la bandeja aceites esenciales en estado vapor, ya que posee un sistema de dosificación y evaporación a vacío de esos AEs para ser inyectados por diferencia de presión en las barquetas donde se tienen los filetes de dorada, antes de aplicar los gases MAP y de realizar el termosellado (Figura 3.1) (López-Gómez y López-Cánovas, 2016). En los ensayos realizados en esta tesis, los filetes de dorada han sido envasados en MAP con distintas dosis de vapor de AEO (50, 75 y 100 $\mu\text{L}/\text{envase}$).

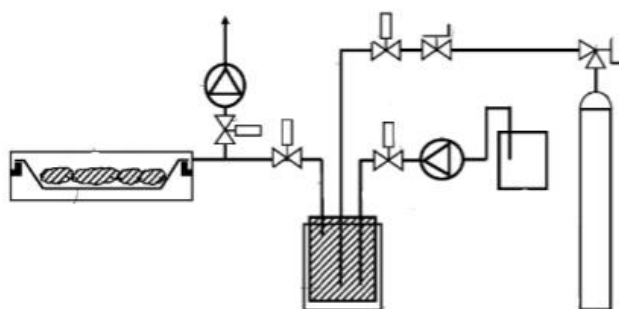


Figura 3.1. Esquema detallado del sistema de inyección de vapores de AEs, por diferencia de presión, sobre el producto antes del envasado MAP (López-Gómez y López-Cánovas, 2016).

3.3. FORMACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO DE INCLUSIÓN PARA PRODUCCIÓN DEL HIELO ANTIMICROBIANO DE CONSERVACIÓN DE DORADA ENTERA

3.3.1. Materiales utilizados para la formación del complejo de inclusión

El complejo de inclusión se realiza con la mezcla de dos materiales, AEs y β -ciclodextrinas (β -CD). Como agentes antimicrobianos naturales se utilizaron AEs. La combinación utilizada para aplicarla en el hielo de conservación de la dorada entera fresca fue la siguiente: Carvacrol : Bergamota : Pomelo (CBP) en relación 3:1:1. Esta

combinación es resultado de estudios previos de otras combinaciones, como la más efectiva para la conservación de pescado fresco y con mejores propiedades organolépticas.

Para la encapsulación de esta combinación de AEs se seleccionaron las β -CD. Los aceites esenciales de carvacrol, bergamota y pomelo se obtuvieron de Lluch Essence (España). Las β -CD fueron proporcionados por Roquette (Francia).

El complejo de inclusión AEs+ β -CD se preparó manualmente utilizando una relación equimolar 1: 1 (1 g de CBP y 7,6 g de β -CD) mediante la técnica de amasado según el método seguido por Marques (2010).

3.3.2. Metodología utilizada para la producción del complejo de inclusión y fabricación del hielo antimicrobiano

En estudios previos, la combinación más efectiva de AEs fue la de carvacrol, bergamota y pomelo, en una proporción de 3: 1: 1, formando un complejo de inclusión con β -CD, denominado “CBP+ β -CD”.

El hielo para los ensayos de conservación de dorada entera fue producido por nuestro grupo de investigación a escala piloto mediante una máquina de hielo ZIEGRA Eismaschinen (España) y por la empresa CUBIPLAYA SL. para ensayos a escala industrial en máquina de hielo industrial Vogt Ice (EE.UU.).

El hielo utilizado en todos los ensayos de conservación de dorada entera es hielo picado o en escamas y se hace distinción entre:

- ✓ *Hielo control* (sin incluir AEs)
- ✓ *Hielo antimicrobiano* (incluyendo AEs encapsulados en β -CDs como complejo de inclusión favoreciendo su solubilidad en agua y disminuyendo su volatilidad).

El hielo en escamas con AEs+ β -CD incorporado se fabricó agregando el complejo de inclusión AEs+ β -CD en estado sólido (polvo) en el agua potable previamente a su entrada en la máquina de hielo. Las diferentes concentraciones de AEs+ β -CD se expresan como mg de AE por kg de hielo.

La aplicación del hielo para la conservación de dorada en cajas de poliestireno se realizó a modo de capa superficial, una vez ubicado el pescado en el interior de las cajas, cubriendo la totalidad del mismo con una relación de hielo:pescado 1:3 (Imagen 3.5.).



Imagen 3.5. Detalle de aplicación de hielo sobre dorada entera.

Para la conservación en hielo de pescado se evaluaron diferentes concentraciones de AEs. Las dosis evaluadas fueron de 50, 75 y 100 mg AEs / kg de hielo.

3.3.3. Caracterización del complejo de inclusión mediante diferentes técnicas.

El complejo de inclusión que se añade al hielo para la conservación de pescado entero fresco se caracterizó mediante diferentes técnicas que se detallan a continuación:

- ***Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)***

La calorimetría diferencial de barrido (DSC, en inglés Differential scanning calorimetry) es una técnica de análisis térmico generalmente utilizada para determinar el efecto que el calor ejerce sobre las propiedades físicoquímicas de los materiales a analizar. Esta determinación suele aplicarse siguiendo una isoterma o diferentes temperaturas de análisis y presión constante (Demetzos, 2008; Kamimura *et al.*, 2014; Marques, 2010).

La técnica DSC se utilizó para analizar el comportamiento térmico de los complejos de inclusión AEs+ β -CD. Los análisis se realizaron mediante el equipo de DSC 822e (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach, Suiza).

La metodología utilizada fue la siguiente. Cantidades de 10 mg por muestra se colocaron en crisoles de aluminio sellados de 100 μ L cuyos extremos se perforaron con un pin de 50 μ m de diámetro.

Los termogramas se obtuvieron a temperaturas de 25 a 400 °C, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y bajo una atmósfera de nitrógeno con una velocidad de flujo de 50 mL/min. Se obtuvieron termogramas para el aceite esencial puro de carvacrol,

mezcla pura de carvacrol, bergamota y pomelo (3: 1: 1; v / v), β -ciclodextrina pura y los complejos AEs+ β -CD.

▪ Eficiencia de atrapamiento (% EE)

La eficiencia de atrapamiento (EE, en inglés Entrapment efficiency) es una técnica que se emplea para obtener la eficacia del método de formación del complejo de inclusión. Con ella podemos cuantificar de forma porcentual las partículas de la sustancia huésped que quedan atrapadas tanto en el interior del complejo como en su superficie (Kamimura, *et al.*, 2014).

La cantidad de AEs atrapados en el complejo de inclusión se determinó mediante espectroscopia UV-Vis (TECAN Infinitive M200, Männedorf, Suiza) a 254 nm.

Se disolvieron 5 mg de muestra en 5 ml de acetonitrilo y se dejó durante 48 h en reposo tras realizar una mezcla homogénea. Este período de reposo se aplicaba para dejar suficiente tiempo para que todos los compuestos activos atrapados estuvieran en solución. Después de este procedimiento, las soluciones se centrifugaron a 3200 rpm durante 15 minutos para eliminar cualquier β -CD de la solución, dejando solo el compuesto activo (carvacrol, bergamota y pomelo). Se preparó una curva estándar de carvacrol con una concentración que oscila entre 2,5 y 30 $\mu\text{g} / \text{ml}$, en las mismas condiciones.

El % de EE se calculó de la siguiente manera:

$$EE = \frac{\text{cantidad de AEs atrapados}}{\text{Cantidad inicial de AEs}} \times 100$$

Donde la cantidad de AEs atrapados fue la diferencia entre los AEs totales y los AEs adsorbidos en la superficie del complejo de inclusión (Santos *et al.*, 2015; Kamikura *et al.*, 2014).

▪ Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja (FTIR, en inglés Fourier transform infrared spectroscopy) es una técnica cualitativa que detecta las moléculas presentes en la muestra analizada mediante la absorción de la radiación que emiten dichas moléculas en vibración. Las muestras pueden estar en diferentes estados para su análisis (líquido, sólido o gaseoso).

Las vibraciones se clasifican en dos grupos: de tensión y de flexión. Según el tipo de vibración que se genere, las moléculas absorberán una longitud de onda específica debido a su distintivo espectro infrarrojo y se podrán diferenciar los componentes de la muestra. El equipo espectrofotométrico suele ir combinado con un sistema de reflectancia total (Marques, 2010; Piqué and Vázquez, 2012). Esta técnica es efectiva para la determinación de aceites, grasas (Rohman and Che-Man, 2011; Wu *et al.*, 2014) e incluso para caracterizar complejos de inclusión (Marques, 2010).

Para la realización de esta técnica FITR se utilizó 10 mg de cada muestra, mezcla pura de carvacrol, bergamota y pomelo (3: 1: 1; v/v) y los complejos AEs+ β -CD. Los espectros infrarrojos, como resultado de la reflectancia total atenuada, se obtuvieron mediante un espectrómetro Nicolet 5700 (Thermo Inc., Waltham, MA, EE. UU.). El sistema utilizado para obtener la reflectancia total atenuada fue un accesorio de diamante de rebote único (Smart Orbit, Thermo Inc.) a temperatura ambiente (25 °C). Los datos espectrales se trataron en el rango de 3600–2400 cm^{-1} con el software OMNIC 8.0 (Thermo Fisher Scientific Inc.), aunque el espectro completo se recogió en el rango de 4000–400 cm^{-1} .

▪ Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (SEM, en inglés Scanning Electron Microscopy) es una técnica que se ha usado extensamente en investigación debido a su alta resolución para la obtención de imágenes de materiales de pequeño tamaño. El funcionamiento del equipo se desarrolla mediante electrones en vez de luz (Figura 3.2). Para analizar una muestra y determinar su morfología superficial, características estructurales y composición química, se genera un haz de electrones que incide sobre ella y comienza una interacción. Seguidamente se producen dos señales de electrones secundarios y dispersantes como respuesta al impacto que serán transformadas en información para obtener finalmente la imagen deseada (Clavijo, 2013; Ipohorski and Bozzano, 2013).

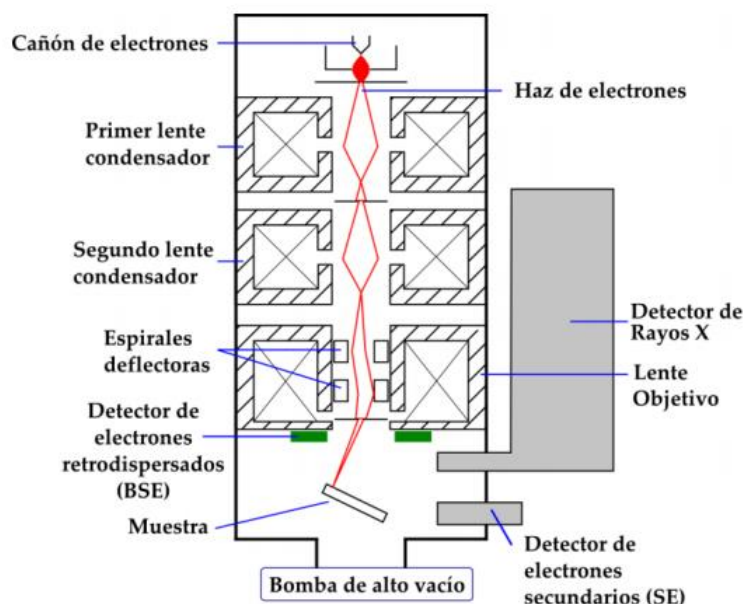


Figura 3.2. Esquema del funcionamiento de un microscopio electrónico de barrido (Clavijo, 2013).

En esta tesis, la morfología de las β -ciclodextrinas y los complejos $AEs+\beta$ -CD fue analizada utilizando un microscopio electrónico de barrido (modelo S-3500N Hitachi). Las muestras se recubrieron con una película delgada de platino y se analizaron a diferentes aumentos: 1000x y 2000x.

3.4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Para el análisis microbiológico se tomaron muestras por triplicado de cada tratamiento aplicado. La preparación de las muestras se realizó de la siguiente manera, se tomaron 25 g de muestra de músculo de dorada, y se diluyeron en 225 mL de agua peptonada (Scharlau, Barcelona) en bolsas estériles de Stomacher, y se homogenizaron en Stomacher (Colwort Stomacher 400 Lab, Seward Medical, Londres, Reino Unido) durante 2 min. Se realizaron diluciones seriadas de cada muestra en agua de peptona estéril (Scharlau, Barcelona). Alícuotas apropiadas (0,1 o 1 ml) se sembraron en placas Petri.

Los microorganismos específicos del pescado analizados fueron:

- Microorganismos Aerobios Mesófilos Totales (AMT): se sembraron en profundidad en agar PCA (Plate Count Agar; Scharlau, Barcelona) y se incubaron a 31 °C durante 48 horas.

- Microorganismos Aerobios Psicrófilos Totales: se sembraron en profundidad en agar PCA (Plate Count Agar; Scharlau, Barcelona) y se incubaron a 4-7 °C durante 7 días.
- *Pseudomonas* sp.: se sembraron en profundidad en agar cetrimida (Scharlau, Barcelona) y se incubaron a 37 °C durante 48 horas.
- *Enterobacteriaceae* spp.: se sembraron en profundidad en agar VRBD (Violet Red Bile Dextrose; (Scharlau, Barcelona), se incubaron a 37 °C durante 24 horas.
- Bacterias Ácido lácticas (BAL): se sembraron en profundidad en agar MRS (Scharlau, Barcelona), se incubaron a 31 °C en microanaerobiosis durante 48 horas.

Tras el proceso de incubación para cada tipo de microorganismo se realizó el recuento del crecimiento de colonias en cada placa y se procesaron dichos datos expresándolos como el logaritmo en base 10 de las unidades formadoras de colonia por gramo de producto (Log UFC/g).

3.5. ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

La evaluación de los parámetros físico-químicos para determinar la calidad del pescado es importante. Con ella se establece el nivel de deterioro del producto durante su período de conservación en base a los valores obtenidos de los diferentes indicadores de calidad. Dichos valores deben ser correlacionados a su vez con los análisis sensoriales realizados. Los parámetros que se evaluarán en esta tesis sobre los productos de dorada para determinar su grado de deterioro físico-químico se citan a continuación.

3.5.1. Determinación del pH

Los valores de pH, tanto en los filetes como en las piezas enteras de pescado, se determinó según Ayala *et al.* (2011). Para ello, se tomaron 5 g de músculo de pescado con pinza y cuchillo y se mezclaron con 10 mL de agua destilada. Tras ello, la mezcla se sometió a una agitación constante con una varilla de vidrio durante 2 minutos. Se dejó reposar durante 5 minutos y se procedió a la medición del pH con un pH-metro BASIC 20, (Crison Instruments Incorporation, Alella, Barcelona, España), con agitación magnética, previa calibración del equipo.

3.5.2. Determinación de la Capacidad de retención de agua (CRA)

Para la determinación de la CRA del músculo de pescado se siguió el método descrito por Grau and Hamm (1953) y modificado por Hamm (1972), basado en el prensado de la muestra sobre papel de filtro.

Se pesaron 0,3 g de muestra de músculo (sin piel) y se picaron hasta obtener porciones de 0,5 x 0,5 x 0,5 cm. La muestra se colocó sobre el centro de un papel de filtro (Whatman n° 540), previamente pesado, y se sometió a un prensado entre dos placas Petri depositando sobre la misma un peso de 1 kg durante 10 minutos. Los valores obtenidos de CRA se expresan en porcentaje (%).

Para conocer el porcentaje de agua libre de la muestra de músculo de dorada se realizaron los siguientes cálculos:

$$\% \text{ agua libre} = (P_1 - P_0 / P) * 100$$

Donde:

P_1 = Peso final papel

P_0 = Peso inicial de papel

P = Peso de la muestra

La capacidad de retención de agua (CRA) fue calculada de la siguiente forma:

$$CRA = 100 - \% \text{ agua libre}$$

3.5.3. Determinación del Color CIELab

Las medidas de los parámetros de color se realizaron con un Colorímetro Minolta Chroma Meter CR300 (Minolta, Osaka, Japón).

El análisis de color se determinó en el músculo del pescado, específicamente sobre la superficie de la región dorsal mediante el sistema CIELab obteniendo los parámetros L^* , a^* y b^* , que pertenecen al sistema de coordenadas CIE (1986). Cada valor fue el promedio de tres determinaciones por muestras. En el sistema CIE Lab, L^* denota luminosidad en una escala de 0 a 100 de negro a blanco; a^* , (+) rojo o (-) verde; y b^* , (+) amarillo o (-) azul (Schubring, 2002).

3.5.4. Determinación del Perfil de Textura (TPA)

El análisis del perfil de textura (TPA) se utilizó para evaluar la textura muscular en función de la compresión de la muestra con un texturómetro (TA-Xt plus, Stable Micro Systems Ltd. Surrey, Reino Unido) equipado con una celda de carga de 5 kg.

Las mediciones se realizaron con una sonda cilíndrica de extremo plano de 50 mm de diámetro. Para determinar el TPA se tomaron porciones de músculo de la zona dorsal (tanto de filetes como de dorada entera) con unas dimensiones de $2 \times 2 \times 1,5$ cm, lo más homogéneos posible. La medición se compuso de dos ciclos consecutivos de compresión del 50%, con 5 s entre ciclos, perpendicularmente a la orientación de las fibras musculares. La velocidad de la sonda fue de 50 mm min^{-1} . Los datos obtenidos de fuerza por tiempo en cada prueba se usaron para calcular los valores de los parámetros de TPA descritos por Bourne (2002) (Figura 3.3).

- Dureza (N): fuerza máxima del primer ciclo de compresión.
- Elasticidad (mm): altura que recupera el alimento durante el tiempo transcurrido entre los dos ciclos de compresión.
- Cohesividad: relación del área de fuerza positiva durante la segunda compresión en comparación con la de la primera compresión.
- Gomosidad (N): dureza multiplicada por cohesividad.
- Masticabilidad (N/mm): dureza multiplicada por cohesión multiplicada por elasticidad.
- Adhesividad (N/s): es el área negativa del primer ciclo completo de compresión que representa el trabajo necesario para despegar el émbolo de la superficie de la muestra.

Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Cada muestra replicada se analizó por triplicado.



Figura 3.3. Curva teórica para el análisis de Perfil de Textura (Bourne, 1978)

3.5.5. Determinación del Nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA)

Las determinaciones se realizaron por triplicado según el método del Ácido Pícrico descrito por la AOAC (2019).

En primer lugar, se pesaron 10 g de muestra de pescado triturado sin piel ni espinas y se homogeneizaron con 20 mL de ácido tricloroacético al 7,5 % (ScharlauChemie S.A. Barcelona, España). Posteriormente la mezcla se filtró (papel de filtro Whatman N°1). Un mL del extracto filtrado se transfirió a un tubo de ensayo Pyrex con tapón de rosca y se añadió 4 mL de agua destilada, 1 mL de formaldehído 37 % (Panreac Química SAU, Barcelona), 10 mL de tolueno (Panreac Química SAU, Barcelona), y 3 mL de disolución de carbonato potásico 0,7 M (Panreac Química SAU, Barcelona). Toda la mezcla fue agitada vigorosamente.

A continuación, se tomaron 5 mL de la fase de tolueno y se transfirieron a un tubo de ensayo con 0,3 g de sulfato sódico anhidro para deshidratar el tolueno durante unos minutos en agitación suave. El contenido se decantó sobre otro tubo de ensayo seco y se añadieron 5 mL de la disolución de trabajo de ácido pícrico 0,87 mM.

Finalmente, se midió la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 410 nm mediante un espectrofotómetro Zuzi modelo 4110RS y se cuantificó el N-TMA en 100 g de pescado con referencia a una curva patrón. Para la realización de la curva de calibrado se preparó una solución patrón de trimetilamina, 1 mg N-TMA/mL. La solución de trabajo

de trimetilamina 0,01 mg NTMA/ mL consistió en la disolución de 1 mL de la solución patrón de trimetilamina 1 mg N-TMA/ mL en 100 mL con agua destilada. Se agregó 1 mL de HCl 1:3 antes de enrasar. Con esta solución final de trabajo, se adicionó la cantidad correspondiente de 0 mL, 1 mL, 2 mL y 3 mL respectivamente en 4 tubos con rosca, adicionándoles un volumen determinado de agua destilada tal y como muestra la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Cantidades y compuestos para realizar la curva de calibración utilizada en la determinación de la Trimetilamina.

mg N-TMA Nominal	(mL) de 0.01 mg N-TMA/mL	(mL) de agua destilada
Blanco	0	4
0.01	1	3
0.02	2	2
0.03	3	1

3.6. EVALUACIÓN SENSORIAL

Los atributos sensoriales del pescado fueron evaluados por un panel de siete panelistas. La evaluación del pescado se realizó utilizando el sistema de la Unidad de Investigación de Alimentos de Tasmania (TRFU) modificado por Cakli *et al.* (2007) y Erikson *et al.* (2019), y desarrollado como método de índice de calidad (QIM). Para realizar la evaluación sensorial se tomaron 3 réplicas de cada condición estudiada. Para cada día de análisis y para cada parámetro, se obtuvieron las puntuaciones medias de los panelistas. Los atributos de calidad QIM que los panelistas tuvieron que valorar en pescado fresco están detallados en la Tabla 3.2. y varían de 0 (pescado muy fresco) a 40 (pescado en mal estado) puntos de demérito.

Además, la evaluación sensorial por parte de panelistas también se realizó para pescado cocinado. La muestra de músculo de pescado (25 g) de la región dorsal se cocinó individualmente en un horno microondas a máxima potencia (850 W) durante 2 minutos, e inmediatamente después se presentó a los panelistas. La evaluación sensorial se realizó en cabinas individuales bajo condiciones estandarizadas de luz, temperatura y humedad relativa. Se pidió a los panelistas que calificaran el olor, el sabor y la textura del pescado utilizando una escala hedónica descriptiva 0-10 (Papadopoulos *et al.*, 2003).

Tabla 3.2. Tabla de valoración sensorial de dorada fresca según los parámetros QIM. (Cakli *et al.*, 2007 y Erikson *et al.*, 2019).

Área del pescado	Parámetros de calidad	Puntuaciones	
Aspecto general	Apariencia de la piel	Muy brillante	0
		Ligeramente brillante	1
		Opaco/decolorada	2
		Verde/amarillento (abdomen)	3
		Pálido/opaco	4
	Textura de la piel	Muy firme o elástica	0
		Firme	1
		Blanda	2
		Muy blanda	3
		Deforme	4
	Olor de la piel	Fresco/algas marinas	0
		Neutro	1
		Metálico	2
		Deteriorado/agrio	3
		Muy deteriorado/podrido	4
	Ventre y opérculo	Gris/ plateado	0
		Gris/Blanco	1
		Gris/ manchas amarillentas	2
		Gris/ manchas marrones	3
Área bucal	Resistencia bucal	Muy resistente	0
		Poco resistente	1
		Sin resistencia	2
	Color boca	Rosado	0
		Amarillento	1
Ojos	Córnea ocular	Transparente	0
		Opaca y/o roja	1
		Ligeramente lechosa	2
		Lechosa/gelatinosa	3
	Ojos	Negro brillante	0
		Ligeramente lechoso	1
		Lechoso/opaco	2
		Blanco mate	3
	Forma ojos	Convexo	0
		Plano	1
		Hundido	2
Deformado		3	
Agallas	Color	Rojo brillante	0
		Rojo pálido/rosa	1
		Marrón claro	2
		Marrón/gris	3
	Olor	Fresco	0
		Metal	1
		Agrio	2
		Podrido	3
	Mucosidad	Ausencia	0
		Transparente	1
		Lechoso, gelatinoso	2
Marrón gelatinoso		3	
Área anal	Mucosidad	Ausencia	0
		Ligera presencia	1
		Presencia	2
	Aspecto	Cerrado	0
		Ligeramente abierto	1
Abierto		2	
Puntuación Total QIM			0-40

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar, se realizó un análisis descriptivo de todos los datos, expresando los resultados como media y error estándar de las determinaciones realizadas. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) utilizando el software SPSS (v.19 IBM, Nueva York, EEUU) teniendo en cuenta un nivel de significación $p < 0.05$ para establecer la influencia del tipo de envasado y el tiempo de almacenamiento en las distintas variables analizadas. También se utilizó el test de Tuckey, para la comparación de las medias dentro de cada grupo para los distintos periodos de almacenamiento.

Se realizó un análisis de regresión para determinar la vida útil del pescado envasado. Los datos se ajustaron mediante un modelo lineal, $Y = a + bX$, donde Y representa el recuento de aerobios mesófilos y X representa el tiempo de almacenamiento.

PARTE II

Resultados y discusión

Dorada fileteada



CAPÍTULO 4

Estudio de la influencia de la temperatura de conservación sobre la vida útil de filetes de dorada

CAPITULO 4. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE CONSERVACIÓN REFRIGERADA SOBRE LA VIDA ÚTIL DE FILETES DE DORADA

4.1. Introducción

Ya se ha comentado antes, en el Capítulo de Introducción de esta Tesis, el gran interés que tiene el uso de la tecnología de envasado en atmósfera modificada (envasado MAP) para la conservación de filetes de pescado, ya que es un producto fácil de preparar y con un consumo al alza. Pero, también, se ha destacado que en esta tecnología de envasado MAP, es indispensable establecer la combinación óptima de gases para cada tipo de pescado, junto con un control estricto de la temperatura, ya que son parámetros determinantes de la calidad y vida útil de estos productos frescos refrigerados (Tsironi *et al.*, 2011).

En efecto, según Tsironi *et al.* (2011) el crecimiento de bacterias del ácido láctico en filetes de dorada con envasado MAP depende sobre todo de la temperatura y de la concentración de CO₂. Estos autores describieron matemáticamente esta dependencia mediante una ecuación tipo Arrhenius para el rango de temperaturas de 0 a 15 °C y para una proporción de CO₂ de 20 a 80%. Estos autores validaron este modelo de comportamiento de esta dependencia en condiciones de cadena de suministro refrigerado a temperatura constante y variable. También, Campus *et al.* (2011) obtuvieron que cuando la temperatura de conservación de los filetes de dorada con envasado MAP (60% CO₂ / 40% N₂) es de 4 °C el máximo de vida útil es de 13 días, según el Método del Índice de Calidad (QIM, *Quality Index Method*, en inglés). Sin embargo, cuando se utilizan temperaturas de abuso de 8 °C se reduce drásticamente el tiempo de vida útil hasta los 6 días, utilizando la misma combinación de gases en el envasado MAP. Pero, estos mismos autores (Campus *et al.*, 2011) encontraron que si se baja la temperatura de conservación a 2 °C no se mejoran sustancialmente los valores de parámetros de calidad sensorial ni la vida útil de los filetes de dorada. Sin embargo, Tsironi *et al.* (2011) sí que encontraron que cuanto más baja es la temperatura de conservación mayor es la vida útil de los filetes de dorada, pero los tiempos de vida útil que se obtenían mediante el modelo eran excesivos, con un error superior al 30%.

Parlapani *et al.* (2014) pusieron de manifiesto experimentalmente que las diferentes temperaturas de conservación y atmósferas modificadas afectan el crecimiento de la

microbiota alterante, así como la vida útil de los filetes de dorada envasados. Obtuvieron en sus investigaciones que la vida útil con envasado en aire, a unas temperaturas de conservación de 0 y 5 °C, fue de 14 y 5 días, respectivamente, mientras que con envasado MAP (60% CO₂/10% O₂/30% N₂) fue de 20 y 8 días, respectivamente, a las mismas temperaturas de conservación. También, Garrido *et al.* (2016) estudiaron el envasado de filetes de dorada de acuicultura en condiciones aeróbicas, al vacío y en atmósfera modificada (pero con una composición de gases distinta a los anteriores autores, de 40% CO₂/30% O₂/30% N₂), conservando a una temperatura de 3±1 °C durante 14 días, tratando de reproducir las condiciones de venta minorista. Los resultados mostraron que el envasado MAP es una buena alternativa para extender la vida útil de los filetes refrigerados de dorada, pero no apreciaron diferencias significativas de aumento de vida útil respecto del trabajo de Campus *et al.* (2011) que utilizaban un envasado MAP con una composición de atmósfera de 60% CO₂ / 40% N₂, sin O₂.

El envasado MAP (30% O₂/ 40% CO₂/ 30% N₂) se ha recomendado para peces bajos en grasa (como la dorada), mientras que se han propuesto mezclas de gases de 40-60% CO₂ y 60-40% N₂ para el envasado MAP de pescado graso (Davis, 1998; Parlapani *et al.*, 2014; Pastoriza *et al.*, 1998; Robertson, 1993; Sacks y Gore, 1987). Sin embargo, Campus *et al.* (2011) compararon las proporciones 60 % CO₂ / 40 % N₂ (MAP1) y 60 % CO₂ / 30 % O₂ / 10 % N₂ (MAP2) en conservación de dorada, y consiguieron la mayor vida útil con envasado MAP2, en base a parámetros sensoriales (utilizando el método QIM).

Dado que el envasado MAP con O₂ requiere de equipos de termosellado con mayores sistemas de seguridad y más caros, y que, a la vista de la bibliografía, no está claro si es interesante conservar a menos de 2 °C los filetes de dorada con envasado MAP, en esta parte de la Tesis se ha tratado de determinar la temperatura óptima de conservación de filetes de dorada envasados en MAP sin O₂, y con la proporción de gases de mayor consenso en la conservación de filetes de pescado (60 % CO₂ / 40 % N₂) (Mendes, 2019), para intentar extender su vida útil hasta los 21-28 días.

4.2. Plan experimental

Para llevar a cabo estos ensayos se tomaron 45 doradas frescas, recién capturadas, procedentes de acuicultura (suministradas por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo, S.L.) con un peso medio de 500 ± 50 g por individuo.

El fileteado de la dorada se llevó a cabo en condiciones ultralimpias en una cabina de flujo laminar (clase 100) ubicada en el interior de una sala blanca (Clase 10000) a 8 °C. Los 90 filetes de dorada obtenidos se envasaron en bandejas de polipropileno de 0,75 L de capacidad (2 filetes por bandeja) en MAP con una combinación de gases de 60 % CO₂ y 40 % N₂ y posteriormente fueron termoselladas con film Cryovac® EOP616B descrito en el Capítulo 3. Material y Métodos, en la termoselladora Efaman (Efabind, Murcia) situada en el interior de la sala blanca indicada anteriormente (Figura 4.1.).

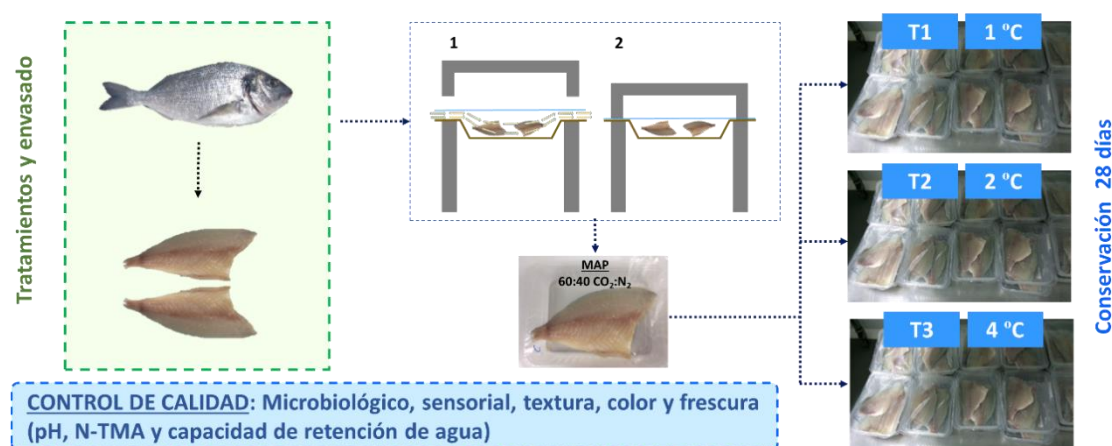


Figura 4.1. Plan experimental para el estudio de determinación de la temperatura más adecuada de conservación de filetes de dorada con envasado MAP.

Los filetes envasados se llevaron a cámaras frigoríficas donde se conservaron a las temperaturas seleccionadas de 1, 2 y 4 °C (con diferencial de temperatura de $\pm 0,5$ °C). Se analizaron los días 1, 7, 14, 21 y 28, tomando 3 bandejas por día de análisis para realizar las determinaciones microbiológicas, físico-químicas y sensoriales cuyos resultados se detallan a continuación.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Análisis Microbiológico

Las enterobacterias no aparecieron hasta los 7 días de almacenamiento (Figura 4.2., A). Esta ausencia fue mayor en los filetes almacenados a 1 °C donde no aparecieron hasta los 21 días de conservación. Considerando los resultados obtenidos, observamos que la temperatura de 1 °C retrasa la aparición de las enterobacterias hasta 21 días, pero cuando aparecen, el recuento es mayor que a la temperatura de almacenamiento de 2 °C.

Los filetes recién envasados presentaron una carga de microorganismos psicrófilos de 2 Log UFC/g. Estos microorganismos fueron aumentando su concentración durante el tiempo de almacenamiento, pero este aumento fue mayor a la temperatura de 4 °C. Las temperaturas de almacenamiento de 1 y 2 °C retrasan el desarrollo de estos microorganismos con respecto a la temperatura de 4 °C (Figura 4.2., B)

Las bacterias ácido lácticas (BAL) en los filetes envasados se incrementaron a partir del día 7 para todas las temperaturas de almacenamiento ensayadas. Aunque la temperatura de 4 °C fue la que tuvo un mayor aumento de esta flora a lo largo del periodo de conservación (Figura 4.2., C), sobre todo a partir del día 14.

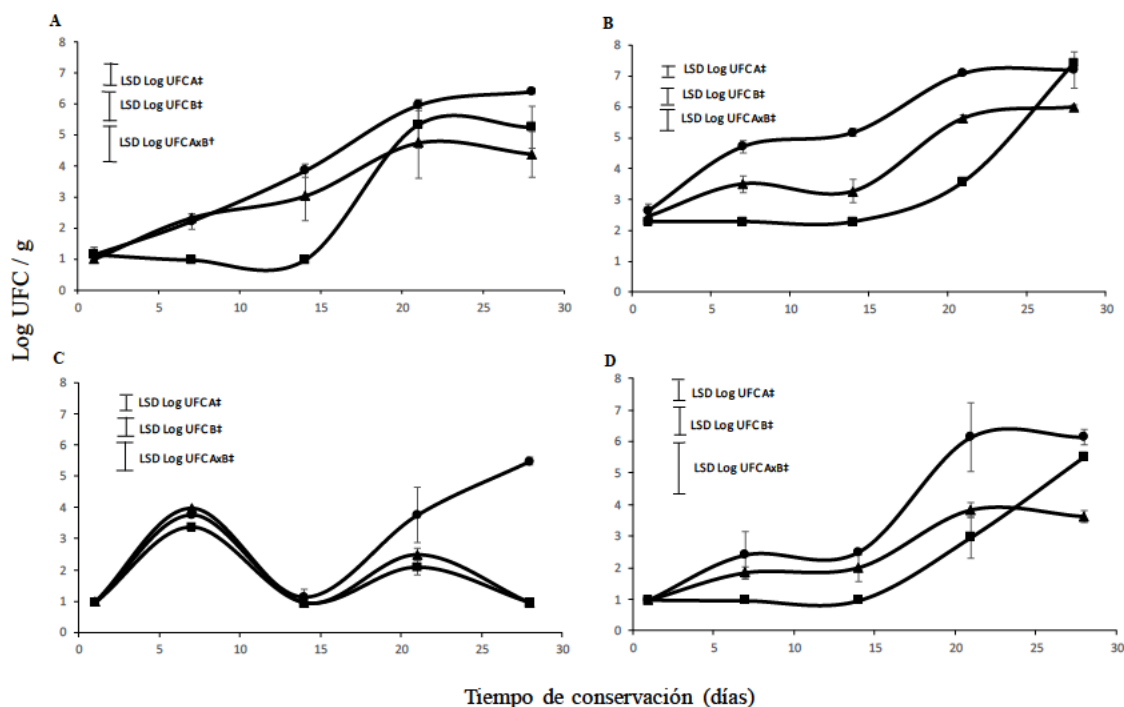


Figura 4.2. Recuentos (log UFC/g) de *Enterobacteriaceae* (A), microorganismos psicrófilos (B), bacterias ácido lácticas (C) y *Pseudomonas* (D) en filetes de dorada almacenados a 4 °C (●), 2 °C (▲) y 1 °C (■).

En cuanto a recuento de *Pseudomonas*, observamos un aumento progresivo de estos microorganismos a lo largo de la conservación, siendo este crecimiento claramente superior en los filetes almacenados a 4 °C. Al igual que ocurrió con las Enterobacterias, en los filetes almacenados a 1 °C, no se produce un incremento significativo de recuento de *Pseudomonas* hasta el día 21 de almacenamiento. No obstante, al final del periodo de conservación (28 días) los filetes a 1 °C presentaban una mayor población de *Pseudomonas*, que los filetes almacenados a 2 °C (Figura 4.2., D)

Los microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) fueron los microorganismos más abundantes en todas las condiciones estudiadas (Figura 4.3.). Teniendo en cuenta la legislación que establece en alimentos un contenido máximo de 7 log UFC/g de AMT (ICMSF, 1986), se pone de manifiesto que la vida útil es de 21 días para la temperatura de almacenamiento de 4 °C mientras que es de 28 días cuando la temperatura es de 2 °C. A 1 °C no se ven diferencias significativas de vida útil respecto de la temperatura de 4 °C al final del periodo de conservación. Estos resultados son similares a los encontrados en el recuento de microorganismos psicrófilos.

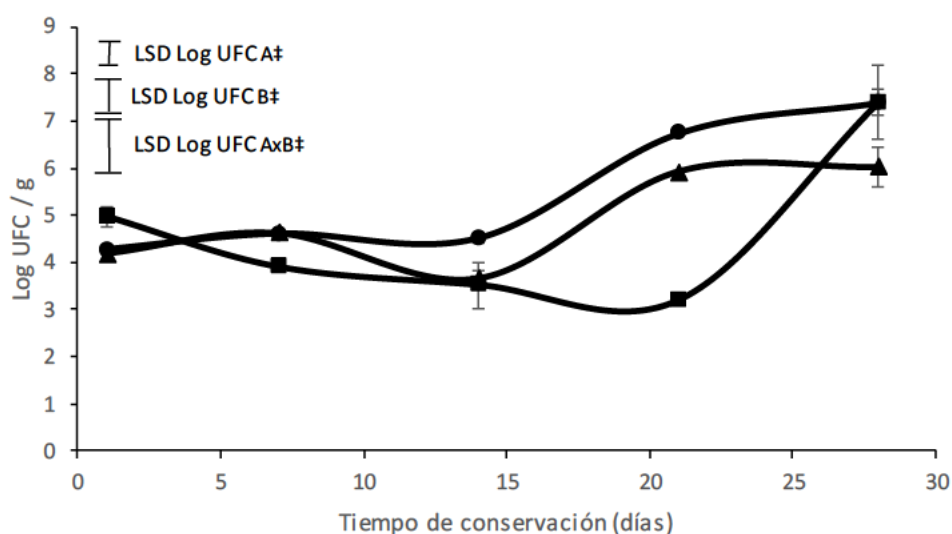


Figura 4.3. Recuentos (Log UFC/g) de microorganismos aerobios mesófilos (AMT) en filetes de dorada almacenados a 4°C (●), 2°C (▲) y 1°C (■).

La evolución de las *Pseudomonas* es uno de los parámetros indicadores del deterioro de la calidad de los peces en general, y de la dorada en particular (Carrascosa *et al.*, 2015). Sin embargo, el recuento microorganismos psicrófilos también han sido considerado por varios artículos científicos (Carrascosa *et al.*, 2015; Khoshnoudi-Nia *et al.*, 2019; Mol *et al.*, 2007; Olatunde *et al.*, 2019) como críticos para determinar el deterioro de peces

(específicamente dorada) y para obtener el final de su vida útil. Esos estudios indicaron que la estimación de los microorganismos psicrófilos da mejores resultados para la estimación de la vida útil del pescado refrigerado que los AMT y 6 log UFC / g podrían aceptarse como el límite de aceptabilidad. Es por ello, por lo que teniendo en cuenta el trabajo de investigación que se consulte, tanto *Pseudomonas*, AMT como psicrófilos son microorganismo que sirven para la estimación de la vida útil de pescado fresco. Con los resultados obtenidos en esta Tesis se llegaría a la misma vida útil de los filetes de dorada envasada en MAP, teniendo en cuenta los recuentos de aerobios mesófilos totales, psicrófilos y pseudomonas.

4.3.2. Análisis físico-químicos

- **Determinación del pH**

El pH de los peces es un parámetro importante de calidad fisicoquímica, ya que los incrementos de pH del músculo de los peces durante el almacenamiento pueden atribuirse al crecimiento de bacterias en descomposición y a la acumulación de compuestos alcalinos debido a la descomposición de proteínas y la posterior descarboxilación de aminoácidos producidos, como los compuestos de amoníaco (como TMA) (Özyurt *et al.*, 2012).

Los valores de pH aparecen comprendidos entre 6,4 y 7,0 (Tabla 4.1.). Se mantuvieron relativamente constantes durante todo el periodo de almacenamiento, aunque con una leve tendencia a aumentar. Se aprecian diferencias significativas de pH ($p < 0,05$) entre las distintas temperaturas de conservación y a lo largo del almacenamiento a partir del día 7 de muestreo. El aumento del pH durante el periodo de almacenamiento es normal en pescado como consecuencia de la acumulación de compuestos nitrogenados derivados de la autólisis y la degradación bacteriana (Garrido *et al.*, 2016). Los días 7 y 14 de conservación existieron diferencias significativas de pH entre los filetes conservados a 1 °C y los mantenidos a 2 y 4 °C, presentando estos últimos menores valores de pH. En el día 21 de conservación, los filetes conservados de 4 °C obtuvieron el mayor valor de pH de 7,11, que es similar a los valores obtenidos por Masniyon *et al.* (2005) en el día 9 de conservación de lubina en filetes. En cambio, al final del período de conservación los filetes conservados a 2 °C presentaron el valor más bajo de pH (6,53), coincidiendo con las mayores diferencias de pH entre temperaturas de conservación ($p < 0,05$).

Tabla 4.1. Valores de pH en filetes de dorada almacenados a 4, 2 y 1 °C (n=3±SD).

Parámetro	Tª (°C)	1	7	14	21	28
pH	1	6,53±0,05 ^{Ab}	6,51±0,11 ^{Ab}	6,57±0,04 ^{Ab}	6,69±0,08 ^{Bab}	6,86±0,26 ^{Aa}
	2	6,50±0,04 ^{Aab}	6,40±0,02 ^{Bb}	6,46±0,02 ^{Bb}	6,69±0,03 ^{Ba}	6,53±0,02 ^{Cab}
	4	6,49±0,04 ^{Abc}	6,41±0,02 ^{Bc}	6,46±0,01 ^{Bbc}	7,11±0,02 ^{Aa}	6,64±0,03 ^{Bb}

Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

- **Capacidad de retención de agua (CRA)**

La capacidad de retención de agua es la propiedad inversa a la exudación de líquido por el músculo del pescado durante su almacenamiento en refrigeración (Olsson *et al.*, 2003). Con los cambios autolíticos se produce la hidrólisis del glucógeno y las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas sufren alteraciones, lo que da lugar a una disminución de la capacidad de ligar agua del músculo y tiene consecuencias sobre la textura y la apariencia. Álvarez *et al.* (2012) afirman que un incremento de la pérdida de agua de los filetes está relacionado con el deterioro del pescado. Es decir, un valor bajo de porcentaje en CRA es indicativo de una pérdida de calidad de los filetes.

Al final del periodo de almacenamiento los cambios producidos en la CRA fueron muy leves (Tabla 4.2.) y los valores se mantuvieron en el rango considerado para pescado fresco, que según Campus *et al.* (2014) es de un 70-80 % para pescado fresco. Las temperaturas de 2 y 4 °C muestran diferencias significativas con respecto a los filetes conservados a 1 °C a partir del día 21, temperatura en la cual se refleja un aumento de la CRA que pudo ser debido a la congelación y descongelación que sufrieron los filetes.

Tabla 4.2. Valores de capacidad de retención de agua (CRA) en filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).

Parámetro	Tª (°C)	1	7	14	21	28
CRA	1	71,19±0,83 ^{Ba}	70,16±4,86 ^{Ca}	73,32±0,26 ^{Ba}	74,82±1,49 ^{Ba}	75,04±1,81 ^{Ba}
	2	76,89±2,26 ^{Aa}	75,75±1,49 ^{Ba}	75,90±1,76 ^{Ba}	78,12±1,67 ^{ABa}	79,11±1,71 ^{Aa}
	4	78,26±1,49 ^{Aa}	79,71±2,16 ^{Aa}	80,72±0,28 ^{Aa}	81,23±3,24 ^{Aa}	76,92±0,02 ^{ABa}

Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

- ***Determinación del Color***

Los cambios de color que tienen lugar en el pescado están asociados en general con el deterioro de la apariencia. La oxidación de lípidos implica cambios en el color, adquiriendo tonalidades grises y amarillentas. La carne del pescado fresco es translúcida, pero el pescado deteriorado, tiende a ser opaca. El mucus existente sobre la piel, que al principio es claro y acuoso, se enturbia, se hace grumoso y adquiere tonalidades diversas como resultado del abundante crecimiento microbiano (Sikorski, 1990).

Respecto a los valores del parámetro L^* , presentaron oscilaciones durante todo el período de conservación, alcanzando valores comprendidos entre 42 y 52. Se han observado diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto a la temperatura de conservación, y durante el período de conservación de los filetes de dorada (Tabla 4.3.). Santaella (2011) no observó diferencias significativas en el parámetro L^* en filetes de dorada envasadas a vacío y almacenadas en refrigeración durante 22 días, siendo la media de valores registrados similares a los obtenidos en el presente estudio. Por otro lado, se observa en general una tendencia a disminuir en los valores de a^* a lo largo del tiempo de conservación de los filetes. Por el contrario, se aprecia un aumento de estos mismos valores únicamente en los filetes conservados a 4 °C. Para los valores de b^* se observa un aumento desde los resultados negativos, al inicio de la conservación refrigerada (reflejando un color azul-grisáceo), hasta los valores positivos, a los 28 días que son indicativos de tonos amarillos. Estos resultados de color coinciden con los encontrados por Masniyom *et al.* (2005), que obtienen altos valores de b^* en el envasado MAP debido a la formación de color amarillento en la superficie.

Tabla 4.3. Evolución de los parámetros de color en filetes de dorada durante su período de conservación a las temperaturas de 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).

Tiempo (Días)	Tª (°C)	L*	a*	b*
1	1	44,01±0,71	1,86±0,20	-2,36±0,53
	2	45,05±0,18	1,26±0,25	-2,29±0,06
	4	45,45±0,39	2,16±0,61	-3,01±0,43
7	1	43,71±1,92	2,11±0,17	-1,28±0,09
	2	48,36±0,53	1,28±0,10	-2,16±0,28
	4	48,08±0,58	1,35±0,19	-2,23±0,44
14	1	48,02±0,37	1,86±0,03	-1,55±0,01
	2	48,62±0,82	1,46±0,36	-2,01±0,10
	4	49,60±0,54	1,52±0,08	-2,07±0,17
21	1	42,85±0,64	1,79±0,23	2,05±1,02
	2	46,23±0,91	2,77±0,07	-0,72±0,09
	4	48,28±0,72	3,25±0,06	1,93±0,05
28	1	48,18±0,59	-0,29±0,03	1,26±0,35
	2	47,28±0,35	0,90±0,07	-1,91±0,03
	4	51,28±0,83	3,02±0,00	1,72±0,08
Temperatura (A)		(0,88)‡	(0,37)‡	(0,41)‡
Tiempo (Días) (B)		(1,14)‡	(0,48)‡	(0,53)‡
A x B		(1,97)‡	(0,83)‡	(0,91)‡

ns: no significancia ($p>0,05$); *, †, ‡ significancia para $P \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente.

• *Análisis de perfil de textura (TPA)*

La degradación del tejido muscular durante el almacenamiento de la dorada se asocia principalmente al desprendimiento de miofibras al sarcolema, lo que provoca una pérdida de adhesión interfibrilar (Ayala *et al.*, 2010; Taylor *et al.*, 2002). De acuerdo con nuestros resultados (Tabla 4.4.), la textura de los filetes de dorada cambió sobre todo a partir de los 14 días de conservación, con cambios más significativos en las temperaturas de 1 y 4 °C, respecto de 2 °C que se mantiene relativamente más estable. Se ha sugerido que cuando el tejido muscular alcanza un umbral de deterioro específico, se puede alcanzar un límite y, por lo tanto, no se pueden detectar otras diferencias de textura instrumentalmente (Ayala *et al.*, 2010). En efecto, durante el periodo de almacenamiento se observa una variación sobre todo de los parámetros dureza y gomosidad en los filetes de dorada (Tabla 4.4.). La disminución del parámetro gomosidad fue más notable en los filetes conservados a 2 °C.

Tabla 4.4. Evolución del análisis de perfil de textura (TPA) en filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).

Tiempo (Días)	T ^a (°C)	Dureza	Cohesividad	Adhesividad	Elasticidad	Gomosidad	Masticabilidad
1	1	12,51±0,14	0,32±0,04	-0,68±0,03	0,35±0,01	4,48±1,28	2,01±0,64
	2	12,66±1,27	0,32±0,01	-0,81±0,11	0,32±0,02	6,04±0,33	2,01±0,40
	4	12,74±0,66	0,32±0,03	-0,70±0,00	0,32±0,04	3,95±0,14	1,28±0,12
7	1	12,20±0,73	0,29±0,01	-0,55±0,04	0,42±0,01	3,37±0,10	1,39±0,03
	2	12,35±2,37	0,24±0,01	-0,63±0,13	0,33±0,01	3,54±0,44	1,23±0,20
	4	14,34±1,21	0,28±0,02	-0,79±0,14	0,32±0,02	4,00±0,03	1,47±0,15
14	1	14,66±2,70	0,34±0,02	-0,58±0,05	0,44±0,02	4,93±0,60	2,15±0,31
	2	12,82±0,34	0,33±0,03	-0,82±0,08	0,33±0,00	3,67±0,41	1,31±0,07
	4	14,00±0,44	0,32±0,02	-0,78±0,07	0,34±0,04	5,15±0,05	1,68±0,15
21	1	15,57±4,28	0,37±0,01	-0,61±0,09	0,44±0,01	5,33±0,66	2,50±0,38
	2	12,08±3,89	0,26±0,03	-0,65±0,08	0,30±0,03	2,39±0,63	0,67±0,18
	4	17,41±5,29	0,27±0,06	-0,63±0,05	0,29±0,04	2,10±0,67	0,56±0,14
28	1	13,62±1,08	0,31±0,02	-0,45±0,08	0,48±0,01	4,27±0,09	2,06±0,00
	2	11,30±1,12	0,24±0,04	-0,63±0,09	0,34±0,03	3,72±0,32	0,67±0,10
	4	15,50±0,59	0,28±0,02	-0,47±0,04	0,32±0,01	2,52±0,32	0,85±0,02
Temperatura (A)		ns	(0,03)‡	(0,09)‡	(0,03)‡	(0,82)‡	(0,38)‡
Tiempo (Días) (B)		(1,45)*	(0,04)‡	(0,12)‡	(0,03)‡	(1,06)‡	(0,49)‡
(A x B)		(4,79)‡	(0,06)†	(0,20)‡	(0,06)‡	(1,84)‡	(0,85)‡

 ns: no significancia ($p>0,05$); *, †, ‡ significancia para $P \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente.

La gomosidad y masticabilidad están relacionados con la dureza del músculo de los filetes. Con respecto a la cohesividad, la adhesividad y la elasticidad, se aprecia que los valores se mantienen durante el período de conservación.

• *Determinación del N-TMA*

Se observó un aumento progresivo de los valores de N-TMA (mg N / 100 g) en filetes de dorada a lo largo del periodo de almacenamiento (Figura 4.4.). Este aumento de N-TMA se produce sobre todo a partir del día 14 en los filetes conservados a 4 °C, con diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a las otras dos temperaturas de conservación. Este incremento de N-TMA fue más notable al final del periodo de conservación (28 días), donde el valor obtenido para 4 °C fue considerablemente mayor que el obtenido a 1 °C y 2 °C.

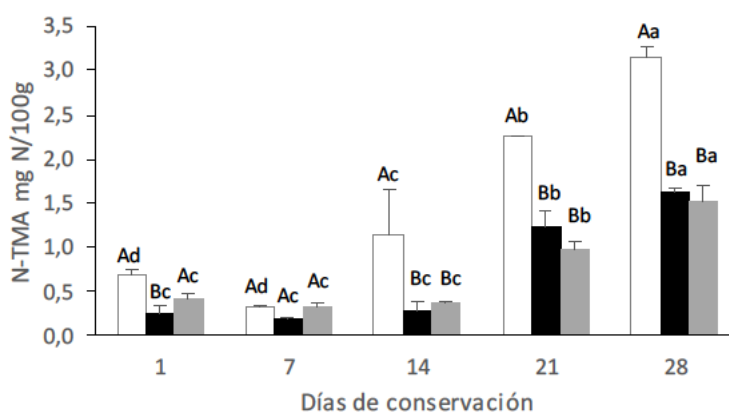


Figura 4.4. Evolución del N-TMA (mg/100g) en filetes de dorada durante el almacenamiento a 4 °C (barra blanca), 2 °C (barra negra) y 1 °C (barra gris), ($n=3 \pm SD$). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

Los filetes que presentan un mayor valor de N-TMA son los conservados a 4 °C alcanzando valores máximos en torno a 3,45 mg N/100 g a los 28 días. A 1 °C y 2 °C los valores obtenidos a los 28 días de conservación estuvieron por debajo de 2 mg/100 g.

Según la FAO (1986) los valores de N-TMA en pescado fresco se encuentran en torno a 1 mg N/100 g, mientras que en pescado deteriorado ascienden a los 8 mg N/100 g. En cambio, Sikorski *et al.* (1989) establecen el límite de aceptabilidad para pescado fresco en 5-10 mg /100 g de N-TMA. De esta forma, se pone de manifiesto que los valores obtenidos de N-TMA en estos ensayos de conservación de filetes de dorada a distintas

temperaturas (1, 2 y 4 °C) están por debajo de los valores establecidos para pescado deteriorado. No obstante, es cierto que los valores de N-TMA que se corresponden con el pescado más fresco son los de filetes conservados a 1 y 2 °C, no encontrándose diferencias significativas entre ambas temperaturas.

4.3.3. Análisis sensorial

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial QIM de los filetes de pescado durante el almacenamiento se muestran en la Figura 4.5.

Inicialmente y hasta los 7 días de conservación, se observa una aceptación general de los filetes de dorada independientemente de la temperatura de conservación. Las muestras conservadas a 4 °C presentaron peor olor y sabor debido a una mayor degradación, a partir del día 14 de análisis, con respecto a las otras dos temperaturas estudiadas, alcanzando la máxima puntuación a los 21 de conservación generando su rechazo por parte de los panelistas. Sin embargo, los filetes conservados a temperaturas más bajas son mejor puntuados hasta los 28 días de almacenamiento, indicando mejor estado del producto y mayor calidad. Si tenemos en cuenta las puntuaciones al final del período de conservación, observamos que los filetes almacenados a 2 °C muestran una mayor aceptabilidad por parte de los evaluadores y podemos seleccionar esta temperatura como la más adecuada para la conservación para este producto.

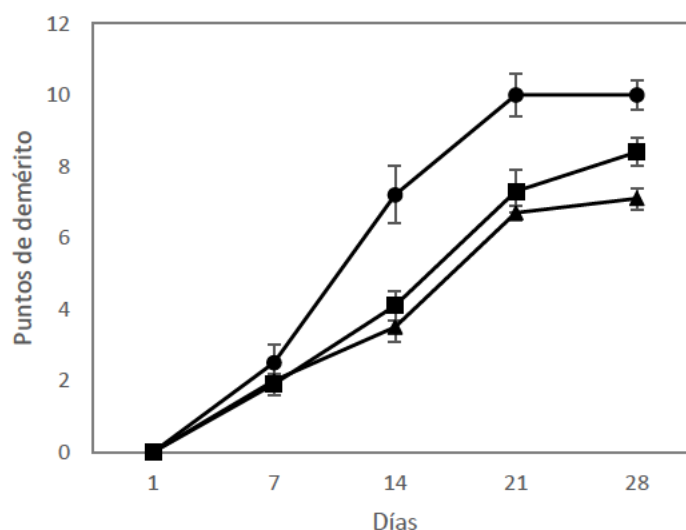


Figura 4.5. Puntuaciones QIM de filetes de dorada cocinados tras su conservación en MAP a las temperaturas de 4 °C (●), 2 °C (▲) y 1 °C (■).

4.4. Conclusiones

Los resultados microbiológicos muestran que la temperatura de 4 °C es la más desfavorable para conservación de filetes de dorada con envasado MAP, ya que es la que presenta un mayor crecimiento para todos los microorganismos estudiados, superando los límites legales para mesófilos totales a los 28 días y a los 21 días para los psicrofilos.

Las temperaturas de 1 y 2 °C son más adecuadas para la conservación refrigerada de filetes de dorada con envasado MAP, obteniendo una vida útil de hasta 28 días. No obstante, los recuentos de *Enterobacteriaceae* spp, *Pseudomonas* sp. y aerobios mesófilos totales son mayores para los filetes conservados a 1 °C, quizá debido a que en algún momento es posible que se alcanzara la congelación de los filetes y esta circunstancia provocara la mayor proliferación de microorganismos.

En los parámetros físico-químicos podemos destacar que el N-TMA para las temperaturas de 1 y 2 °C se encuentra por debajo de 2 mg N/100 g al final de su vida útil, siendo este valor indicativo de frescura. Los valores de los parámetros pH, CRA, textura y color se mantienen bastante estables durante todo el período de conservación, independientemente de la temperatura de conservación.

De acuerdo con la legislación vigente que determina el valor máximo de los parámetros que establecen la calidad físico-química y microbiológica del pescado, y los resultados obtenidos y la discusión de los mismos, se puede concluir que la temperatura de almacenamiento refrigerado que consigue una mejor conservación de los filetes de dorada con envasado MAP es la temperatura de 2 °C, ya que evita el peligro de una posible congelación del músculo, cosa que puede ocurrir a la temperatura de 1 °C.

CAPÍTULO 5

**Estudio de nuevos sistemas de
envasado activo antimicrobiano
para alargar la vida útil de
filetes frescos de dorada.**

CAPITULO 5 ESTUDIO DE NUEVOS SISTEMAS DE ENVASADO ACTIVO ANTIMICROBIANO CON PROCESADO MÍNIMO PARA ALARGAR LA VIDA ÚTIL DE FILETES FRESCOS DE DORADA.

5.1. Introducción

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, el proceso de envasado para mantener o mejorar la calidad de los productos es clave en su conservación, sobre todo si se envasan productos frescos como filetes de pescado. El envasado en atmósfera modificada (MAP) en combinación con la refrigeración es uno de los sistemas de envasado más utilizados y efectivos para conservar productos frescos, y reducir el crecimiento microbiano, evitando así una temprana degradación del producto (Corbo *et al.*, 2005; Davies, 2011; Tsironi *et al.*, 2011).

Para que el envasado MAP sea eficiente se deben establecer dos variables dependientes principales, tanto la combinación de gases (concentración de CO₂, O₂ y N₂), como la temperatura de refrigeración más adecuadas para mantener la calidad y seguridad alimentaria del producto fresco a envasar durante más tiempo (Tsironi *et al.*, 2011). Campus *et al.* (2011) estudiaron la vida útil de filetes de dorada envasados en MAP (60 % CO₂ / 40 % N₂) y conservada a diferentes temperaturas de refrigeración (2, 4 y 8 °C). Estos autores concluyeron que a mayor temperatura de conservación (8 °C) mayor es la reducción en la vida útil del producto y por lo tanto mostraron peor calidad sensorial durante su período de conservación, sin obtener diferencias significativas entre las temperaturas de 2 y 4 °C. En cambio, Parlapani *et al.* (2014) sí que obtuvieron diferencias en la conservación de filetes de dorada envasada en MAP y conservada a 0 y 5 °C, consiguiendo extender su vida útil en hasta 8 días con temperatura más bajas de conservación.

El uso de aceites esenciales como agentes naturales es una alternativa a los conservantes químicos para mejorar la vida útil de productos frescos debido a sus características antimicrobianas y antioxidantes (Burt, 2004). Si el sistema de envasado se combina con la aplicación de agentes naturales externos que interactúan con el producto generando un efecto sinérgico favorable, hablamos de envase activo (Dini, 2015; Nagarajarao, 2016). El envase activo antimicrobiano es efectivo normalmente en alimentos sólidos donde la contaminación microbiana ocurre en la superficie (Appendini and Hotchkiss, 2002).

El aceite esencial de orégano (AEO) ha sido aplicado en múltiples estudios de vida útil de pescado tanto entero como fileteado con diferentes metodologías de conservación debido a sus múltiples propiedades beneficiosas (Atrea *et al.*, 2009; Bensid *et al.*, 2014; Calo *et al.*, 2015; Dini, 2015; Frangos *et al.*, 2010; Hassoun and Emir-Çoban, 2017; Wu *et al.*, 2014). Van Haute *et al.* (2016) evaluaron el efecto del marinado de salmón con los AEs orégano, canela y tomillo sobre su calidad microbiológica. Wu *et al.* (2014) aplicaron un recubrimiento a base de quitosano con AEO sobre carpa plateada y analizaron el desarrollo microbiano durante su conservación refrigerada. Mejlholm y Dalgaard (2002) y Pyrgotou *et al.* (2010) también estudiaron el efecto antimicrobiano del AEO en salmón y trucha aplicándolo de manera directa sobre su superficie antes del envasado en MAP. Todos estos estudios consiguieron una reducción sobre el crecimiento de microorganismos alterantes del pescado tratado con AEO con respecto a las muestras no tratadas, aumentando así su vida útil y manteniendo su calidad. Sin embargo, el AEO aplicado de forma directa y altas dosis puede afectar negativamente a las propiedades organolépticas del producto generando aromas y/o sabores desagradables (Burt, 2004). El envasado MAP incluyendo vapor de AEs o la aplicación de nanoemulsiones de AEs son técnicas alternativas que pueden dar solución a esta problemática.

Las principales ventajas de las nanoemulsiones son una alta estabilidad física, alta biodisponibilidad y baja turbidez (Ghosh *et al.*, 2013). Además, si se combinan con AEs aumentan su poder inhibitorio frente a microorganismos alterantes y patógenos (Özogul *et al.*, 2016, Özogul *et al.*, 2017; Ros-Chumillas *et al.*, 2017; Shadman *et al.*, 2017). A su vez, la nanoemulsión enmascara los aspectos negativos de los AEs (Donsì and Ferrari, 2016).

El sistema de envasado MAP incluyendo AEs de forma directa en estado vapor como envase activo posibilita disminuir las dosis aplicadas de los AEs minimizando los efectos negativos sobre las características sensoriales de los productos frescos sin afectar su eficiencia en la descontaminación superficial de los mismos (Cai *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2018; López-Gómez *et al.*, 2019; Seo *et al.*, 2015).

Aunque en el capítulo anterior hemos concluido que la temperatura óptima de conservación de los filetes de dorada envasados en MAP es de 2 °C, en este estudio hemos querido ampliar nuestro campo de estudio añadiendo a su vez otras variables previas al envasado como los sistemas de descontaminación con nanoemulsión de orégano y la aplicación de vapores de aceite esencial de orégano como envase activo.

5.2. Plan experimental

Para estudiar nuevos sistemas de envasados activos antimicrobianos, se tomaron doradas (*Sparus aurata*) frescas procedentes de acuicultura (suministradas por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo, S.L.), con un peso medio de unos 500 ± 50 g por individuo.

Las doradas frescas se separaron en tres grupos correspondientes a los tratamientos de descontaminación. Los procesos descabezado y fileteado, así como la aplicación de los tratamientos de descontaminación se realizaron en una cabina de flujo laminar (clase 100) ubicada en el interior de una sala blanca (clase 10.000) a 8 °C (Figura 5.1).

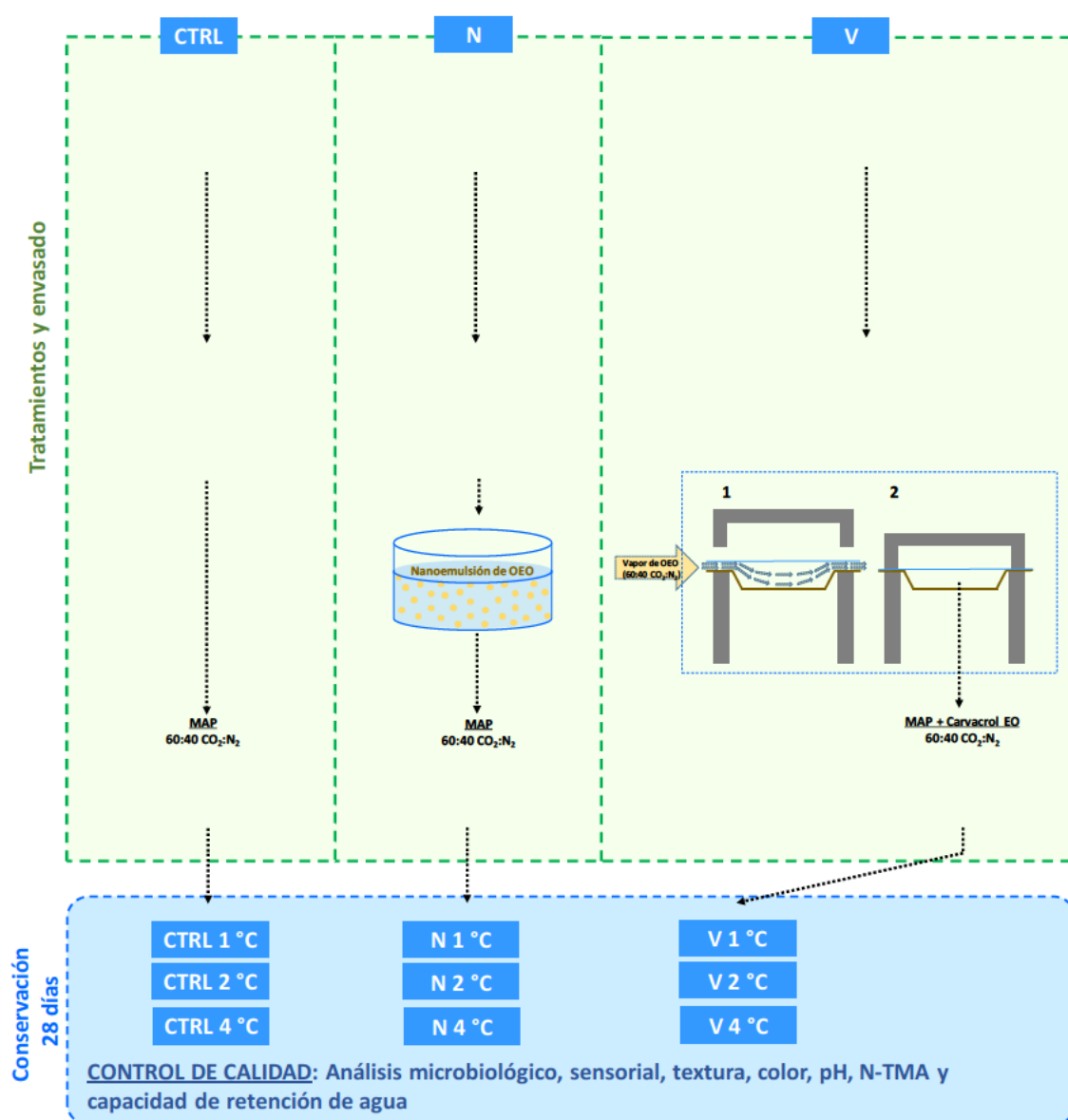


Figura 5.1. Plan experimental para el estudio de vida útil de filetes de dorada aplicando distintas tecnologías de descontaminación y envasado MAP para su conservación a diferentes temperaturas.

Los tratamientos de descontaminación que se realizaron se estructuran de la siguiente manera:

- **CTRL:** el pescado entero no tratado (sin descontaminación previa al envasado) fue descabezado y fileteado.
- **TN:** el pescado entero fue descontaminado con una solución fría (4 °C) de nanoemulsión de AEs al 0,1% mediante inmersión del individuo durante 30 segundos. Posteriormente, fue descabezado y fileteado. Los filetes fueron también descontaminados mediante su inmersión en una solución de nanoemulsión de AEs al 0,1% a 4 °C durante 2 minutos. El tiempo de inmersión de 2 minutos para los filetes se seleccionó en base a experimentos previos para asegurar una descontaminación microbiana adecuada sin afectar la aceptación sensorial de las muestras.
- **TV:** el pescado entero fue descontaminado con una solución fría (4 °C) de nanoemulsión de AEs al 0,1% mediante inmersión del individuo durante 30 segundos. Posteriormente, fue descabezado y fileteado. Los filetes se envasaron en MAP con inyección de vapor de AEO ($67 \mu\text{L L}^{-1}$) y bajo una combinación gaseosa de 60% CO₂:40% N₂. El envasado de los filetes aplicando vapor de AEO se realizó en una termoselladora patentada por nuestro grupo de investigación (Capítulo 3; Figura 3.1.), capaz de inyectar vapor de AEs durante el envasado a través de su vaporización en condiciones de vacío (5-10 hPa). El envase se termoselló automáticamente en el mismo equipo utilizando un film Cryovac® EOP616B (39 μm de espesor; Cryovac, Fuenlabrada, Madrid). La concentración de vapor de AEO se seleccionó en base a experimentos preliminares con filetes de pescado analizando la cantidad máxima de AEO que no transfirió olores y/o sabores desagradables al producto. La mezcla de gases fue seleccionada como la más apropiada para extender la vida útil de dorada, basada en evaluaciones sensoriales según Campus *et al.* (2011).

El envasado MAP de las muestras de los tratamientos CTRL y TN se realizó usando la misma termoselladora y la misma combinación de gases como se describe en el tratamiento TV, pero sin inyección de AEO.

Los filetes (≈ 95 g por filete) necesarios para cada uno de los tratamientos ensayados se envasaron en bandejas de polipropileno (PP) de 0,75 L de capacidad (2 filetes por

bandeja) y se almacenaron en refrigeración a 1, 2 y 4 °C (con diferencial de temperatura de $\pm 0,5$ °C). Las muestras se analizaron los días 0, 7, 14, 21 y 28, tomando 3 bandejas por tratamiento y día de muestreo para realizar las determinaciones microbiológicas, físico-químicas y sensoriales cuyos resultados se detallan a continuación.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Análisis Microbiológicos

Los resultados de los análisis microbiológicos llevados a cabo en este ensayo se muestran en la Tabla 5.1.

Los recuentos iniciales para *Enterobacteriaceae spp.*, bacterias ácido lácticas y *Pseudomonas sp.* fueron muy bajos para todos los tratamientos (CTRL, TN y TV).

Las enterobacterias no mostraron un gran incremento durante los primeros 7 días de almacenamiento en los filetes de dorada, a partir de los cuales mostraron un aumento progresivo. Aunque no existieron diferencias significativas entre tratamientos ($p > 0,05$), sí que presentaron diferencias significativas a lo largo del período de conservación (0,001). Para los filetes almacenados a 1 °C observamos unos valores en torno a 1 log UFC/g que se mantiene hasta los 21 días de almacenamiento, en el que su crecimiento es mayor respecto de los filetes almacenados a 2 y 4 °C (> 5 log UFC/g) con diferencias significativas ($p < 0,001$). Este hecho puede ser debido a un efecto del proceso de congelación y descongelación que sufrieron los filetes a causa del diferencial térmico del control del equipo de refrigeración.

Kostaki *et al.* (2009) y Garrido *et al.* (2016) reportaron valores similares a los obtenidos en nuestro ensayo con filetes de pescado envasados en MAP.

Tabla 5.1. Evolución del crecimiento de microorganismos en filetes de dorada durante su período de conservación a las temperaturas de 1, 2 y 4 ° C (n=3±SD).

Tiempo (Días)	Tratamiento	Temperatura (°C)	<i>Enterobacteriaceae spp</i>	AMT	BAL	Psicrófilos	<i>Pseudomonas spp</i>
1	CTRL	4	1,13±0,24	4,27±0,01	0,95±0,00	2,42±0,59	0,98±0,03
		2	0,98±0,03	4,17±0,05	0,98±0,03	2,35±0,49	0,95±0,00
	Nanoemulsión	1	1,13±0,24	3,93±0,11	0,95±0,00	1,15±0,21	0,98±0,03
		4	0,98±0,03	2,64±0,19	0,95±0,00	0,95±0,00	1,45±0,21
		2	0,95±0,00	2,55±0,07	0,95±0,00	1,13±0,24	0,98±0,03
	Vapor	1	0,95±0,00	3,20±0,19	1,57±0,38	1,00±0,00	0,98±0,03
		4	0,95±0,00	2,75±0,32	0,95±0,00	1,24±0,33	1,33±0,52
		2	0,95±0,00	2,81±0,20	1,65±0,92	0,95±0,00	0,98±0,03
		1	0,95±0,00	2,99±0,06	1,65±0,92	0,95±0,00	1,13±0,24
7	CTRL	4	2,11±0,38	4,59±0,10	1,15±0,21	4,59±0,54	2,12±1,16
		2	2,37±0,23	4,65±0,40	0,95±0,00	3,35±0,49	1,48±0,67
		1	0,95±0,00	3,87±0,12	0,95±0,00	0,95±0,00	0,95±0,00
	Nanoemulsión	4	1,89±0,58	2,65±0,71	1,83±1,18	3,26±0,11	0,98±0,03
		2	0,95±0,00	1,81±0,47	0,95±0,00	2,37±0,52	0,95±0,00
		1	0,95±0,00	1,72±0,17	0,95±0,00	0,95±0,00	0,95±0,00
	Vapor	4	1,55±0,84	3,72±0,02	1,45±0,64	3,80±0,15	1,43±0,67
		2	1,57±0,86	2,32±0,16	0,95±0,00	2,55±0,30	0,95±0,00
		1	0,95±0,00	2,21±0,24	0,95±0,00	1,98±0,39	0,95±0,00
14	CTRL	4	4,32±0,66	4,55±0,41	3,88±0,21	5,28±0,14	2,42±1,33
		2	3,07±0,85	3,63±0,13	3,05±0,06	3,18±0,39	1,82±0,73
		1	0,95±0,00	2,90±0,59	3,42±0,10	0,95±0,00	0,95±0,00
	Nanoemulsión	4	4,61±0,34	5,39±0,11	2,90±1,41	5,05±0,39	3,10±0,92
		2	6,01±4,23	3,85±0,06	1,33±0,52	3,72±0,61	1,54±0,08
		1	0,95±0,00	2,25±0,29	0,95±0,00	1,95±0,07	0,95±0,00
	Vapor	4	3,97±0,13	5,63±0,45	2,16±0,96	5,16±0,19	1,91±0,86
		2	0,95±0,00	3,31±0,06	1,68±1,02	2,98±0,55	0,95±0,00
		1	0,95±0,00	3,01±0,97	0,95±0,00	2,68±0,47	1,80±1,19

21	CTRL	4	5,85±0,34	6,78±0,00	4,30±1,12	7,13±0,07	5,96±0,73
		2	4,53±0,95	5,90±0,13	2,60±0,21	5,77±0,14	3,85±0,31
		1	5,31±0,84	3,11±0,09	2,01±0,44	3,55±0,00	2,64±1,22
	Nanoemulsión	4	6,17±0,05	6,87±0,01	1,60±0,00	7,15±0,03	4,36±0,05
		2	4,53±0,18	5,47±0,46	1,45±0,21	5,48±0,98	3,33±0,30
		1	5,35±0,78	4,95±0,22	1,24±0,33	4,94±0,37	3,33±0,54
	Vapor	4	5,81±0,07	6,75±0,21	3,71±1,24	6,66±0,07	3,72±0,16
		2	4,54±0,06	5,35±0,56	0,98±0,03	5,78±0,74	4,07±0,22
		1	5,74±0,00	6,93±0,03	0,95±0,00	7,20±0,03	3,84±0,08
28	CTRL	4	6,43±0,17	7,43±0,78	5,45±0,21	7,16±0,54	3,74±0,37
		2	4,41±0,76	6,06±0,52	0,95±0,00	6,32±0,28	3,69±0,20
		1	5,29±0,63	7,30±0,45	0,95±0,00	7,50±0,06	5,52±0,16
	Nanoemulsión	4	6,16±0,10	7,26±0,13	4,66±0,45	7,07±0,39	2,45±0,71
		2	5,87±0,12	5,88±0,04	2,38±0,32	6,71±1,06	2,05±0,13
		1	3,66±0,20	4,98±0,28	0,95±0,00	5,79±1,67	2,13±0,24
	Vapor	4	6,08±0,40	8,08±0,07	5,12±1,01	7,97±0,02	3,33±0,46
		2	2,65±0,49	6,47±1,03	2,44±0,68	6,85±0,80	0,95±0,00
		1	5,61±0,34	8,18±0,42	1,83±0,18	7,75±0,01	5,72±0,04
Tiempo (A)			(0,88) ‡	(0,43) ‡	(1,95) ‡	(0,56) ‡	(0,76) ‡
Temperatura (B)			(0,68) ‡	(0,34) ‡	ns	(0,43) ‡	(0,45) †
Tratamiento (C)			ns	(0,34) ‡	(1,51) ‡	(0,33) †	(0,45) †
A x B			(1,53) ‡	(0,75) ‡	(2,58) †	(0,96) ‡	(1,32) ‡
A x C			(0,87) *	(0,75) ‡	(1,93) *	(0,96) ‡	(1,01) †
B x C			ns	(0,58) ‡	ns	(0,75) ‡	(0,78) †
A x B x C			(2,16) ‡	(1,07) ‡	ns	(1,04) †	(1,43) †

ns: no significancia ($p>0,05$); *, †, ‡ significancia para $P \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente.

Al final del periodo de almacenamiento (día 28) los filetes CTRL que estaban a 2 °C presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto a los almacenados a 4 °C, obteniendo un recuento de 2 unidades logarítmicas menos para los filetes conservados a menor temperatura. Esta tendencia se mantuvo también en los filetes del TN y TV a 2 °C, donde encontramos recuentos de entre 1 y 1,5 log UFC/g menores que en los filetes almacenados a 4 °C ($p < 0,001$).

Considerando los resultados obtenidos, donde la temperatura de 2 °C presenta un mejor control de los microorganismos, observamos que, la descontaminación tanto con nanoemulsión como con vapor de AEO, permite aumentar la vida útil de los filetes con respecto a los filetes CTRL.

Con respecto a las bacterias ácido lácticas (BAL), presentaron recuentos muy bajos, en torno a 1 log UFC/g, en los filetes de dorada para todos los tratamientos y temperaturas de conservación, sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) hasta el día 14 de conservación, a partir del cual comenzaron a aumentar los recuentos (Tabla 5.1). Observamos valores inferiores a los obtenidos por Garrido *et al.* (2016), puesto que sus valores iniciales se corresponden con nuestros recuentos de BAL realizados a los 14 días de conservación y similares a los obtenidos por Volpe *et al.* (2015).

En los días 14, 21 y 28 de conservación podemos apreciar diferencias significativas ($p < 0,001$) entre tratamientos conservados a la misma temperatura, obteniendo menores recuentos (> 1 log UFC/g de reducción) los filetes del TV y TN con respecto del CTRL. La temperatura de 4 °C fue la que mayor crecimiento de BAL presentó durante todo el período de conservación para todos los tratamientos aplicados.

Los microorganismos aerobios mesófilos (AMT) fueron los más abundantes en todas las condiciones estudiadas (Tabla 5.1) presentando diferencias significativas ($p < 0,001$) para todas las variables estudiadas. Los recuentos iniciales, sin tener en cuenta la temperatura de conservación y tras la aplicación de los tratamientos de descontaminación (TN y TV) presentaron diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al CTRL, obteniendo valores de 4 log UFC/g para el CTRL y 2-3 log UFC/g para los TN y TV. Estos resultados son similares a los reportados por Masniyom *et al.* (2005),

En el día 7 de análisis, los recuentos de AMT mostraron una disminución para todos los tratamientos a excepción del CTRL, en el que se observa un aumento. Esta disminución se puede explicar por el efecto de la combinación de gases de la atmósfera del envasado

MAP, rica en CO₂, y la temperatura de refrigeración, que, cuanto menor es menor es el crecimiento microbiano.

Los filetes descontaminados con nanoemulsión de AEO (TN) presentaron un comportamiento similar a los observados en los filetes CTRL, si bien, a 2 y 1 °C observamos una reducción en la carga microbiológica de los AMT de 0,5-1 log UFC/g con respecto al CTRL. En los filetes descontaminados con vapor de AEO (TV), encontramos que la vida útil se estableció en 21 días para la temperatura de almacenamiento de 4 °C y a los 28 días para los filetes conservados a 2 °C.

Para todos los tratamientos, teniendo en cuenta la legislación que establece el límite máximo permitido de 7 log UFC/g de AMT (ICMSF, 1986), encontramos que la vida útil está en 21 días para los filetes almacenados a la temperatura de 1 y 4 °C, mientras que los filetes a 2 °C se encontraban dentro de los límites legales establecidos a los 28 días de almacenamiento. Esto supone un aumento de la vida útil de 7 días.

Las *Pseudomonas sp.* están relacionadas con la generación de compuestos nitrogenados, N-TMA, indicativo del deterioro del pescado a lo largo del tiempo, por lo que el aumento de estos microorganismos está relacionado con el aumento de este parámetro (Stamatis and Arkoudelos, 2007). En los filetes CTRL observamos un aumento progresivo de *Pseudomonas sp.*, siendo este crecimiento superior en los filetes almacenados a 4 °C ($p<0,05$) (Tabla 5.1).

Los filetes descontaminados con nanoemulsión de AEO almacenados a 4 °C presentaron un aumento progresivo de las *Pseudomonas sp.* a lo largo del periodo de almacenamiento. Sin embargo, en los filetes almacenados a 2 y 1 °C se inhibió el crecimiento de estos microorganismos indicativos del deterioro del pescado hasta los 21 y 28 días respectivamente, siendo, además, su concentración menor que en los filetes CTRL.

Los filetes TN y TV almacenados a 2 °C presentaron una inhibición de las *Pseudomonas sp.* hasta los 21 y 28 días, respectivamente. A los 21 días de almacenamiento, encontramos una reducción en la concentración de estos microorganismos indicativos del deterioro del pescado de 2,5 log UFC/g en los filetes TN y de 4 log UFC/g en los filetes TV. Los filetes CTRL presentaron una carga de microorganismos psicrófilos de 2 log UFC/g (Tabla 5.1). Estos microorganismos fueron aumentando su concentración durante el tiempo de almacenamiento, pero este aumento fue mayor a la temperatura de 4 °C, presentando diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto a las demás temperaturas estudiadas.

Durante el periodo de almacenamiento de los filetes TN y TV encontramos un escaso desarrollo de microorganismos psicrófilos hasta los 14 días de almacenamiento. Al igual que ocurrió con los filetes CTRL, estos microorganismos fueron aumentando su concentración durante el tiempo de almacenamiento, pero este aumento fue mayor a la temperatura de 4 °C. En cambio, para el tratamiento TN la temperatura de almacenamiento de 2 °C retrasa el desarrollo de estos microorganismos con respecto a la temperatura de 4 °C en 1,5 log UFC/g a los 21 días de almacenamiento.

5.3.2. Análisis físico-químicos

- **Determinación del pH**

Se observó que los valores de pH se mantuvieron muy constantes durante todo el periodo de almacenamiento (Tabla 5.2). Los valores de pH iniciales estaban comprendidos en un rango de 6,3-6,6 y se mantuvieron estables entre dichos valores hasta los 14 días de conservación, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Masniyom *et al.* (2005) en rodajas de lubina envasadas en MAP.

A partir de los 14 días de conservación, los valores experimentaron un aumento hasta el final de la vida útil de los filetes de dorada sin diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos de descontaminación, pero sí se mostraron diferencias significativas entre temperaturas de conservación para el mismo día de análisis. Los valores de pH concuerdan con los obtenidos por Garrido *et al.* (2016) en filetes de dorada envasados en MAP.

El aumento del pH durante el periodo de almacenamiento es una consecuencia normal en pescado como consecuencia de la acumulación de compuestos nitrogenados, altas concentraciones de CO₂ en el envase y un crecimiento de microorganismos mesófilos y psicrófilos totales (Masniyom *et al.*, 2005; Pastoriza *et al.*, 2004; Ruiz-Capillas and Moral, 2001).

Con respecto a los tratamientos de envasado, sí se obtuvieron diferencias significativas a lo largo del período de conservación de los filetes de dorada, mostrando valores más bajos de pH en los filetes tratados con nanoemulsión y vapor de AEO respecto del tratamiento CTRL.

- ***Capacidad de retención de agua (CRA)***

Durante todo el período de conservación, los valores se mantuvieron bastante estables para todos los tratamientos estudiados (Tabla 5.2), presentando cambios muy leves sin observar diferencias significativas ($p < 0,05$). Los resultados se mostraron en concordancia con los obtenidos por Garrido *et al.* (2016) en filetes de dorada envasados en MAP y por Hernández *et al.* (2009) en corvina.

Los resultados obtenidos estaban comprendidos entre un 70-80%, rango que es considerado como pescado fresco según Campus *et al.* (2010). Solo se observaron diferencias significativas con respecto a la temperatura de conservación para los filetes control almacenados a 1 °C, en los que se refleja un aumento de la CRA durante los 28 días de almacenamiento. Este aumento pudo ser debido a la congelación y descongelación que sufrieron los filetes por el diferencial térmico establecido en el control del equipo de refrigeración para esa temperatura.

Los filetes envasados con vapor de AEO a 2 °C, por el contrario, presentan una leve tendencia a disminuir hacia el final del período de conservación, presentando el valor más bajo ($p < 0.001$) de todas las muestras analizadas. Provincial *et al.* (2010) también obtuvieron valores similares en filetes de lubina envasados en MAP a 2 °C.

Álvarez *et al.* (2012) afirman que un incremento de la pérdida de agua de los filetes está relacionado con el deterioro del pescado. Es decir, un valor bajo de porcentaje en CRA es indicativo de una pérdida de calidad de los filetes. Con los cambios autolíticos se produce la hidrólisis del glucógeno y las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas sufren alteraciones, lo que da lugar a una disminución de la capacidad de ligar agua del músculo y tiene consecuencia sobre la textura y la apariencia (Olsson *et al.*, 2003).

- ***Determinación del Color***

Los cambios de color que tienen lugar en el pescado están asociados en general con el deterioro de la apariencia. La oxidación de lípidos implica cambios en el color, adquiriendo tonalidades grises y amarillentas. La carne del pescado fresco es translúcida, pero el pescado deteriorado, tiende a ser opaca. El mucus existente sobre la piel, que al principio es claro y acuoso, se enturbia, se hace grumoso y adquiere tonalidades diversas como resultado del abundante crecimiento microbiano (Sikorski, 1990).

Respecto a la medida del color en los filetes de dorada envasados, los valores de L* presentaron un carácter oscilante durante todo el período de conservación (alcanzando

valores comprendidos entre 39 y 53) aunque no se observaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos realizados ni respecto a las temperaturas de almacenamiento empleadas (Tabla 5.2). Santaella *et al.* (2011) no observó diferencias significativas en los valores L^* en filetes de dorada envasadas a vacío y almacenadas en refrigeración durante 22 días, siendo la media de valores registrados similares a los obtenidos en el presente estudio.

Por otro lado, se observa una tendencia a disminuir con respecto al tiempo de conservación para todos los valores de a^* , aunque, por el contrario, se aprecia un aumento de estos mismos valores únicamente en el tratamiento control conservado a 4 °C.

Con respecto a los valores de b^* , se observa un aumento de los mismos, desde los resultados negativos al inicio de su conservación refrigerada (reflejando un color azul-grisáceo) hasta los 28 días alcanzando valores positivos que son indicativos de tonos amarillos. Resultados que coinciden con los encontrados por Masniyom *et al.* (2005), quienes recogen altos valores de b^* en el envasado en AM debido a la formación de color amarillento en la superficie.

Tabla 5.2. Evolución de los parámetros de Color, pH y CRA de filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).

Tiempo (Días)	Tratamiento	Temperatura (°C)	L*	a*	b*	pH	CRA
1	CTRL	1	49,51±6,36	1,39±0,83	-2,66±0,65	6,58±0,19	71,94±1,68
		2	45,91±1,72	1,09±0,39	-2,51±0,38	6,47±0,06	77,23±1,79
		4	44,73±0,93	1,51±0,86	-2,48±0,96	6,44±0,06	78,52±1,18
	Nanoemulsión	1	47,51±1,24	0,41±0,61	-2,49±0,37	6,44±0,02	78,22±1,41
		2	46,90±0,89	0,72±0,36	-2,41±0,12	6,40±0,04	77,68±0,79
		4	46,88±1,07	1,09±0,40	-2,10±1,10	6,41±0,08	77,11±2,36
	Vapor	1	45,32±1,35	1,18±0,80	-1,96±0,35	6,29±0,01	74,70±0,03
		2	44,58±1,07	1,14±0,20	-2,28±0,91	6,36±0,06	80,24±1,83
		4	45,75±1,29	2,27±0,83	-1,83±0,53	6,35±0,06	79,99±3,09
7	CTRL	1	43,02±2,09	2,02±0,23	-1,36±0,17	6,52±0,10	70,52±4,07
		2	47,93±0,96	1,26±0,40	-2,04±0,74	6,42±0,04	76,23±1,93
		4	47,77±0,78	1,27±0,23	-2,08±0,47	6,37±0,04	79,68±1,69
	Nanoemulsión	1	39,36±1,77	2,41±0,71	-1,37±0,86	6,40±0,00	70,87±1,33
		2	47,80±1,03	2,38±0,59	-1,56±0,59	6,33±0,01	76,04±2,64
		4	47,82±2,67	1,43±0,26	-1,79±0,60	6,38±0,04	77,69±2,98
	Vapor	1	42,67±3,47	1,66±0,57	-1,87±0,70	6,47±0,03	72,71±1,09
		2	47,49±1,05	1,97±0,50	-1,21±0,34	6,44±0,03	80,25±2,42
		4	47,03±1,35	1,36±0,56	-1,67±0,59	6,39±0,09	77,65±1,22
14	CTRL	1	45,71±2,68	1,11±0,89	-1,72±0,34	6,55±0,04	73,32±0,40
		2	47,85±1,69	0,82±0,76	-1,69±0,38	6,46±0,05	75,47±2,09
		4	48,43±1,40	1,66±0,66	-1,81±0,32	6,47±0,04	79,92±0,81
	Nanoemulsión	1	48,29±3,44	0,39±0,49	-2,56±0,40	6,45±0,08	72,55±3,82
		2	48,53±2,59	0,74±1,12	-2,68±0,93	6,49±0,04	74,87±3,66
		4	49,14±2,22	0,87±0,79	-3,02±0,14	6,44±0,03	78,22±2,75
	Vapor	1	45,30±1,15	0,46±0,25	-2,16±0,25	6,45±0,03	75,30±0,80
		2	49,42±0,59	2,03±0,97	-0,73±0,46	6,41±0,05	79,40±0,33

		4	51,00±0,59	0,72±0,22	-0,99±0,83	6,38±0,05	75,23±3,90
21	CTRL	4	45,72±3,34	1,29±0,60	2,05±1,02	6,73±0,09	75,04±0,95
		2	45,91±0,98	2,61±0,34	-0,46±0,33	6,71±0,08	78,23±1,27
		1	47,53±1,61	3,65±0,65	3,43±2,78	7,26±0,17	81,57±4,05
	Nanoemulsión	4	44,44±1,81	1,67±0,47	-2,01±0,26	6,71±0,00	82,18±8,21
		2	47,46±2,21	1,32±0,27	0,75±0,18	6,73±0,05	79,25±0,90
		1	50,29±4,26	2,12±1,22	1,80±0,32	7,17±0,26	75,81±3,59
	Vapor	4	42,68±1,18	0,74±0,01	1,42±1,24	7,17±0,11	73,88±2,19
		2	48,57±0,61	1,85±0,41	1,04±0,49	6,92±0,03	77,82±0,68
		1	49,60±2,61	1,65±0,38	-1,51±0,52	6,84±0,06	79,75±4,20
28	CTRL	4	49,73±1,92	-0,20±0,18	0,35±1,13	6,99±0,51	80,70±4,40
		2	46,58±0,84	0,81±0,19	-1,53±0,45	6,56±0,01	76,47±4,27
		1	49,60±2,10	2,31±0,83	1,73±0,38	6,67±0,02	77,09±0,72
	Nanoemulsión	4	48,99±1,27	1,04±0,11	1,17±1,01	6,66±0,01	75,84±2,05
		2	49,31±3,46	0,95±0,70	0,41±0,20	6,54±0,02	76,33±1,02
		1	51,14±1,73	1,31±0,33	1,14±0,69	6,54±0,02	76,71±0,53
	Vapor	4	44,70±3,37	-0,46±0,33	3,47±1,80	7,21±0,59	74,83±5,53
		2	53,08±3,76	-0,67±0,55	1,33±0,90	6,54±0,03	73,36±1,93
		1	49,53±3,53	1,32±0,65	0,86±0,82	6,56±0,02	77,47±1,59
Tiempo (A)			(1,79) ‡	(0,45) ‡	(0,54) ‡	(0,16) ‡	ns
Temperatura (B)			(1,39) ‡	(0,35) ‡	(0,25) †	(0,09) †	(2,49) ‡
Tratamiento (C)			ns	(0,27) †	(0,42) ‡	ns	ns
A x B			(3,11) ‡	(0,78) ‡	(0,94) ‡	(0,28) ‡	ns
A x C			ns	(0,78) ‡	(0,94) ‡	ns	ns
B x C			(2,41) ‡	(0,47) †	(0,73) ‡	(0,12) *	ns
A x B x C			(3,65) *	(1,55) ‡	(1,89) ‡	ns	ns

ns: no significancia ($p>0,05$); *, †, ‡ significancia para $P \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente.

- ***Análisis de perfil de Textura (TPA)***

La textura es considerada un factor importante en la determinación de la calidad de pescado (Ayala *et al.*, 2010). Todos los parámetros de textura presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al tiempo de almacenamiento, a excepción de la cohesividad, que se mantuvo estable durante todo el período mostrando solo diferencias significativas con respecto a la temperatura de conservación con una variabilidad de 0,02 ($p < 0,001$) (Tabla 5.3).

Los parámetros texturales iniciales de los filetes de dorada no se vieron afectados por los tratamientos aplicados con AEO (TN y TV) ($p > 0,05$). Erkan y Bilen (2010) y Erkan *et al.* (2011) trabajaron con filetes de pescado aplicando diferentes aceites esenciales y tampoco apreciaron alteraciones en sus valores iniciales.

La dureza está relacionada con la gomosidad y masticabilidad, y dichos parámetros presentaron reducciones durante los primeros 7 días, independientemente del tratamiento aplicado y la temperatura de conservación. En los días de muestreo posteriores no mostraron cambios significativos ($p > 0,05$) en la mayoría de los casos, con respecto a los resultados del día 7. Esta disminución en la dureza ha presentado diferencias significativas ($p < 0,01$) con reducciones de 3,13 unidades entre los factores tiempo y tratamiento de las muestras conservadas a 2 y 4 °C.

El desprendimiento de miofibras al sarcolema es la causa principal de la degradación del tejido muscular del pescado y afecta a la adhesión interfibrilar (Ayala *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2014; Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006). De ahí que el parámetro adhesividad presente diferencias significativas ($p < 0,001$) con respecto al tiempo de conservación y ($p < 0,01$) para los factores temperatura y tratamiento.

Con respecto a las muestras conservadas a 1 °C, independientemente del tratamiento aplicado, mostraron unos niveles variables durante todo el período de conservación debido a la fluctuación de la temperatura por el diferencial térmico del equipo de refrigeración, por lo que no se debería tomar esta temperatura como indicativo de calidad en este ensayo. Por el contrario, Suárez *et al.* (2011) analizaron la textura *post mortem* en músculo de dorada conservada en refrigeración a 1 y 4 °C. Obtuvieron que una conservación a 1 °C mantiene la firmeza del músculo durante más tiempo y la conservación a 4 °C ejerce una aceleración en el proceso de degradación del mismo, indicativo de pérdida de calidad. Todos los parámetros de textura analizados durante todo el período de conservación no muestran diferencias significativas ($p > 0,05$) como

interacción con la temperatura de almacenamiento o el tratamiento aplicado. Esta alta variabilidad en los valores obtenidos puede explicarse ya que la degradación del tejido muscular no es homogénea entre las muestras analizadas en los diferentes días de muestreo (Ayala *et al.*, 2010).

Tabla 5.3. Evolución de los parámetros de textura en filetes de dorada durante su almacenamiento a 1, 2 y 4 °C (n=3±SD).

Tiempo (Días)	Tratamiento	Temperatura (°C)	Dureza	Cohesividad	Adhesividad	Elasticidad	Gomosidad	Masticabilidad
1	CTRL	1	15,45±5,69	0,30±0,11	-0,64±0,12	0,36±0,05	4,93±3,41	1,69±0,99
		2	19,60±2,59	0,31±0,02	-0,74±0,30	0,33±0,03	6,04±1,14	2,00±0,55
		4	12,48±2,41	0,32±0,05	-0,69±0,02	0,31±0,03	3,90±0,14	1,19±0,08
	Nanoemulsión	1	16,93±0,16	0,29±0,01	-0,86±0,10	0,33±0,03	4,87±0,13	1,62±0,18
		2	19,38±1,57	0,31±0,04	-0,82±0,07	0,34±0,06	5,96±1,18	1,99±0,05
		4	14,91±5,54	0,25±0,06	-0,86±0,15	0,30±0,02	3,95±2,25	1,20±0,74
	Vapor	1	15,97±3,47	0,31±0,01	-0,78±0,04	0,37±0,01	4,93±0,93	1,81±0,39
		2	13,12±0,98	0,31±0,02	-0,75±0,05	0,35±0,01	4,10±0,02	1,42±0,02
		4	21,85±2,73	0,33±0,03	-0,72±0,12	0,29±0,05	7,17±0,19	2,06±0,40
7	CTRL	1	11,73±1,12	0,30±0,02	-0,57±0,05	0,40±0,04	3,52±0,32	1,39±0,03
		2	13,49±2,99	0,26±0,03	-0,69±0,17	0,33±0,02	3,45±0,70	1,15±0,23
		4	13,47±5,92	0,29±0,03	-0,84±0,16	0,33±0,02	3,77±1,45	1,25±0,46
	Nanoemulsión	1	10,63±1,70	0,35±0,08	-0,47±0,18	0,46±0,12	3,77±1,34	1,80±1,02
		2	12,06±4,07	0,28±0,04	-0,70±0,15	0,35±0,04	3,37±1,32	1,15±0,39
		4	12,11±2,59	0,25±0,03	-0,91±0,16	0,31±0,01	2,99±0,71	0,93±0,25
	Vapor	1	18,53±5,11	0,35±0,03	-0,66±0,04	0,39±0,06	6,55±2,19	2,66±1,25
		2	14,73±3,59	0,30±0,02	-0,70±0,13	0,36±0,04	4,42±1,06	1,59±0,47
		4	15,55±2,82	0,27±0,01	-0,80±0,12	0,38±0,05	4,23±0,64	1,64±0,46
14	CTRL	1	13,01±3,96	0,34±0,02	-0,62±0,08	0,42±0,03	4,41±1,14	1,88±0,60
		2	11,46±2,38	0,32±0,03	-0,77±0,11	0,33±0,01	4,61±1,91	1,54±0,64
		4	15,77±2,11	0,31±0,02	-0,75±0,09	0,32±0,05	4,90±0,31	1,58±0,23
	Nanoemulsión	1	15,94±4,09	0,31±0,02	-0,67±0,15	0,45±0,05	4,80±0,91	2,20±0,62
		2	12,31±4,19	0,26±0,02	-0,70±0,09	0,33±0,06	3,22±1,11	1,11±0,56
		4	14,11±0,83	0,30±0,02	-0,77±0,10	0,30±0,04	4,25±0,39	1,26±0,19
	Vapor	1	14,95±2,48	0,35±0,02	-0,74±0,14	0,38±0,05	5,32±1,08	2,02±0,49
		2	12,43±3,90	0,30±0,02	-0,72±0,11	0,37±0,04	3,67±0,89	1,39±0,47
		4	14,69±3,75	0,30±0,02	-0,75±0,14	0,36±0,03	4,46±1,34	1,65±0,63

21	CTRL	4	13,48±4,28	0,35±0,03	-0,60±0,14	0,46±0,04	4,68±1,42	2,17±0,74
		2	10,53±3,89	0,28±0,04	-0,69±0,11	0,29±0,03	3,05±1,42	0,89±0,46
		1	11,69±5,29	0,32±0,12	-0,54±0,17	0,33±0,09	3,37±2,25	1,03±0,81
	Nanoemulsión	4	9,50±0,90	0,34±0,02	-0,58±0,04	0,44±0,03	3,22±0,46	1,43±0,21
		2	12,40±0,93	0,27±0,04	-0,72±0,09	0,29±0,02	3,37±0,38	0,99±0,14
		1	12,17±3,24	0,30±0,03	-0,77±0,09	0,32±0,01	3,67±1,22	1,17±0,42
	Vapor	4	11,72±5,72	0,38±0,05	-0,53±0,11	0,37±0,06	4,43±2,25	1,72±1,17
		2	12,23±0,51	0,26±0,02	-0,78±0,07	0,37±0,02	3,16±0,28	1,17±0,12
		1	12,51±1,95	0,25±0,02	-0,70±0,10	0,30±0,05	3,19±0,58	0,96±0,23
28	CTRL	4	14,41±1,82	0,30±0,03	-0,48±0,09	0,42±0,07	4,26±0,13	1,80±0,31
		2	10,63±1,61	0,27±0,06	-0,74±0,23	0,36±0,04	2,90±1,00	1,05±0,46
		1	11,97±4,09	0,29±0,03	-0,50±0,08	0,33±0,02	3,50±1,16	1,14±0,33
	Nanoemulsión	4	13,61±1,85	0,38±0,07	-0,47±0,15	0,55±0,18	4,43±2,25	3,40±0,36
		2	10,35±0,71	0,26±0,02	-0,90±0,12	0,34±0,09	2,68±0,21	0,93±0,30
		1	12,85±1,20	0,26±0,03	-0,67±0,07	0,31±0,01	3,42±0,67	1,07±0,22
	Vapor	4	8,78±3,57	0,34±0,07	-0,55±0,09	0,38±0,08	4,25±3,25	1,10±0,52
		2	7,70±1,40	0,34±0,05	-0,50±0,05	0,48±0,15	2,58±0,08	1,25±0,40
		1	11,15±2,64	0,28±0,06	-0,61±0,10	0,37±0,09	3,09±1,03	1,16±0,53
Tiempo (A)			(2,33) ‡	ns	(0,09) ‡	(0,05) ‡	(0,96) ‡	(0,30) †
Temperatura (B)			ns	(0,02) ‡	(0,07) †	(0,04) ‡	(0,58) †	(0,30) ‡
Tratamiento (C)			ns	ns	(0,05) †	ns	ns	ns
A x B			ns	(0,04) †	(0,16) ‡	ns	ns	(0,40) *
A x C			(3,13) †	ns	ns	ns	ns	(0,52) †
B x C			ns	(0,02) *	(0,07) *	(0,06) ‡	ns	ns
A x B x C			(6,26) †	ns	(0,18) *	(0,09) *	(1,95) *	(1,35) ‡

ns: no significancia ($p>0,05$); *, †, ‡ significancia para $P \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente.

- ***Determinación del N-TMA***

Se observó un aumento progresivo de los valores de N-TMA (mg N / 100g) durante el periodo de almacenamiento independientemente de la temperatura de conservación y el tratamiento aplicado (Figura 5.2.A). El aumento de los valores de N-TMA está relacionado con el crecimiento de *Pseudomonas sp.* debido al deterioro del pescado durante su conservación, por lo que este parámetro es indicativo de frescura en el pescado (Amos, 2007).

Los resultados obtenidos durante todo el período de conservación bajo diferentes tratamientos y temperaturas son inferiores a los obtenidos por autores como Garrido *et al.* (2016) y Masniyom *et al.* (2005) en filetes de dorada y rodajas de lubina envasados en MAP, respectivamente. Pero sí son similares a los reportados por Taliadourou *et al.* (2003) en filetes de lubina, por Chouliara *et al.* (2004) en filetes de dorada, o por Mendes y Gonçalves (2008) en filetes de dorada y lubina envasados al vacío.

En los filetes de dorada CTRL se observó un aumento de N-TMA a partir del día 14 principalmente en los filetes almacenados a 4 °C. Este incremento de los valores se mantuvo hasta el final del periodo de almacenamiento (28 días), mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes temperaturas de conservación, donde los valores obtenidos a 4 °C (3,45 mg N/100 g) fueron significativamente mayores que los obtenidos a 1 y 2 °C (1,12 y 1,72 mg N/100 g, respectivamente).

En los filetes descontaminados con nanoemulsión de AEO (Figura 5.2.B) observamos un comportamiento similar a los resultados obtenidos en los filetes CTRL. Se observó un aumento de N-TMA a partir del día 14 sobretudo en los filetes almacenados a 4 °C. Fue a partir del día 21, cuando se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes temperaturas de conservación para esta tecnología de descontaminación, aplicada en el mismo día de muestreo y con respecto a los valores obtenidos en días de análisis anteriores para la misma temperatura.

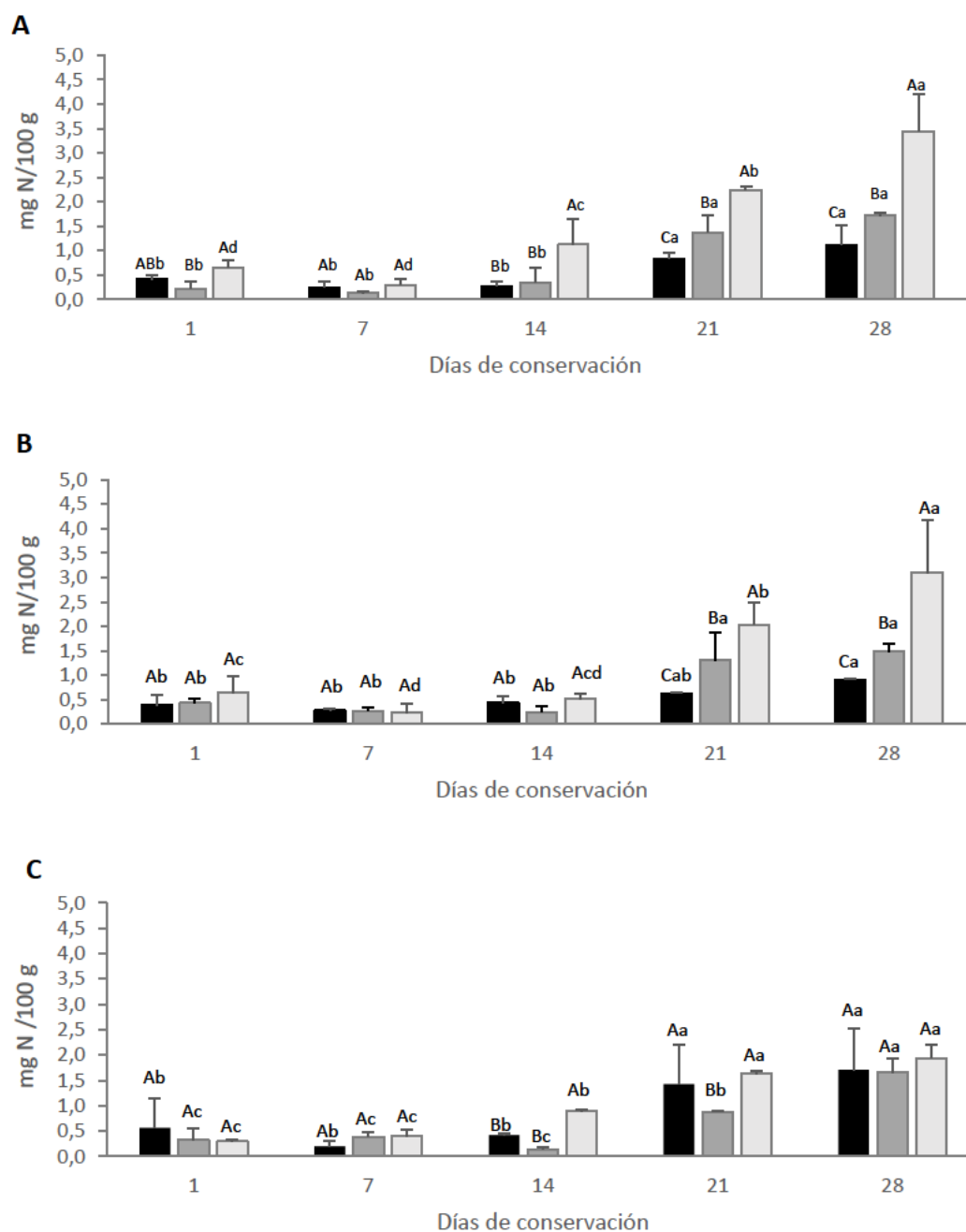


Figura 5.2. Evolución del N-TMA (mg N/100g) en filetes de dorada CTRL (A), con Nanoemulsión de AEO (B) y Vapor de AEO (C) durante el almacenamiento a 1 °C (barras negras), 2 °C (barras gris oscuro) y 4 °C (barras gris claro) ($n=3\pm SD$). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre temperaturas para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para la misma temperatura de conservación.

En los filetes envasados con vapor de AEO (Figura 5.2.C) observamos un aumento a partir de los 14 días, pero a diferencia de los tratamientos anteriores, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el día 21 de conservación para los filetes conservados a 2 °C (0,87 mg N/100 g) con respecto a las otras temperaturas estudiadas

de 1 y 4 °C (1,42 y 1,63 mg N/100 g, respectivamente). Valores similares obtuvieron Goulas y Kontominas (2007) en dorada envasada en MAP con aplicación de AEO.

Así, independientemente de la descontaminación aplicada, los filetes que presentan un mayor valor de N-TMA son los conservados a 4 °C alcanzando valores máximos a los 28 días en torno a 3,45 mg/100 g, 3,59 mg/100 g y 1,93 mg/100 g (tratamiento CTRL, nanoemulsión y vapor AEO, respectivamente). Mientras que a 2 °C, los valores encontrados a los 28 días de almacenamiento estuvieron por debajo de 2 mg/100 g (Figura 5.3).

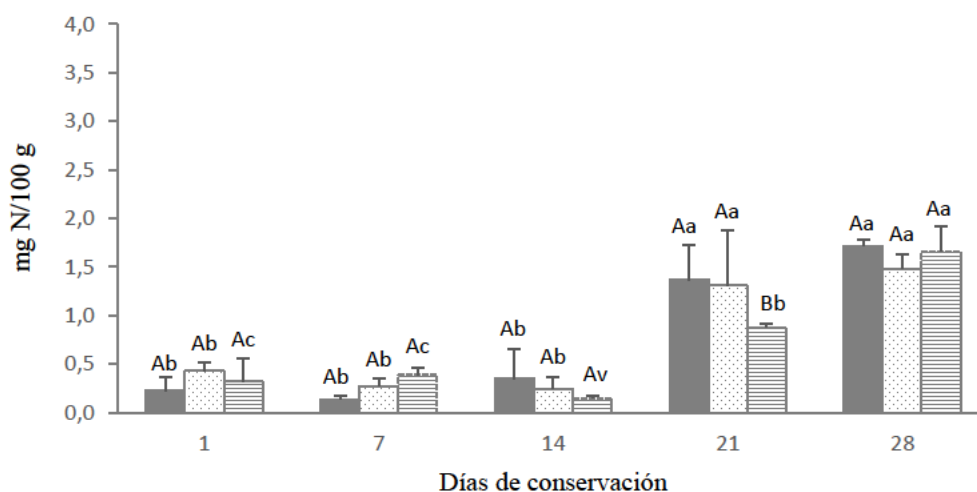


Figura 5.3. Evolución del N-TMA (mg/100g) en filetes de dorada CTRL (barras grises), descontaminados con nanoemulsión de AEO (barras punteadas) y con vapor de AEO (barras rayadas) almacenados 2 °C ($n=3\pm SD$). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos aplicados para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento de descontaminación.

Se han establecido diferentes límites de aceptabilidad en pescado. De acuerdo con Sikorski *et al.* (1990), el límite de aceptabilidad para pescado fresco se establece entre 5-10 mg de N-TMA/100 g, y según la FAO (1986) los valores de N-TMA para pescado deteriorado ascienden a los 8 mg/100 g, mientras que en pescado fresco se encuentran en torno a 1 mg/100 g. En este sentido, encontramos que los valores obtenidos en los filetes de dorada almacenados a 1, 2 y 4 °C, independientemente del tratamiento de descontaminación aplicado, son inferiores a los valores estimados para el pescado deteriorado.

5.3.3. Evaluación sensorial

Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial QIM de los filetes de pescado durante el almacenamiento tras su cocinado se muestran en la Figura 5.4. Este método de evaluación sensorial para pescado, QIM, es recomendado por ser objetivo y sencillo (Martinsdottir *et al.*, 2003).

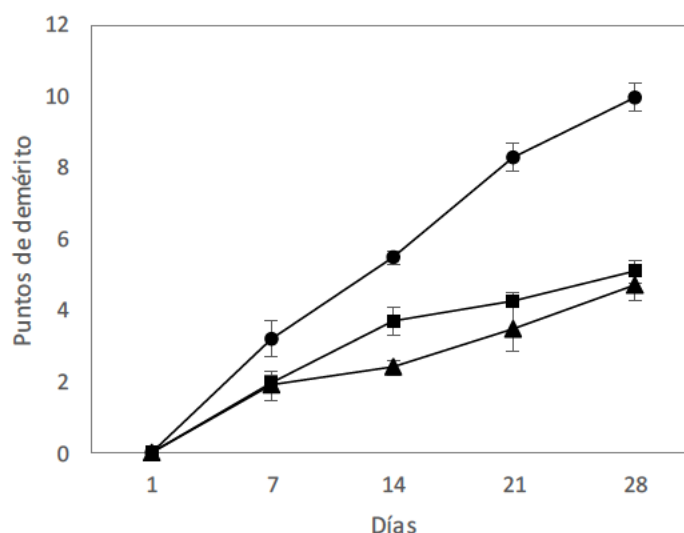


Figure 5.4. Puntuaciones QIM de filetes de dorada cocinados ($n=3\pm SD$). Muestras no tratadas (CTRL, ●); descontaminación de los filetes por inmersión con nanoemulsión de AEO (TN, ■); filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (TV, ▲).

Las puntuaciones iniciales indicaron una mayor calidad de las muestras durante los primeros 7 días de conservación. A partir de los 14 días, la evaluación sensorial mostró una degradación progresiva de los filetes hasta el final del período de almacenamiento.

Los panelistas rechazaron las muestras CTRL cuando la puntuación por deméritos era superior a 6, de manera similar a Giarratana *et al.* (2016). Las muestras de los tratamientos TN y TV mostraron los valores más bajos durante todo el período de almacenamiento, mientras que los valores más altos pertenecen a los filetes del CTRL. Particularmente, el sabor y el olor determinaron el punto de rechazo de las muestras cocinadas en un umbral QIM (Huidobro *et al.*, 2000). En este sentido, el límite de aceptabilidad para las muestras CTRL, independientemente de la temperatura de conservación, se superó a los 21 días, así como las muestras de los TN y TV conservadas a 1 y 4 °C. Por el contrario, los filetes de los TN y TV conservados a 2 °C aún se aceptaron tras 28 días.

Del mismo modo, no se apreciaron sabores ni olores extraños y/o desagradables relacionados con los AEs en los filetes de dorada debido a los tratamientos aplicados. Una

evaluación sensorial similar fue reportada por autores como Mejlholm y Dalgaard (2002), que extendieron la vida útil de 11-12 a 21-26 días de filetes de bacalao envasados en MAP con la misma combinación de gases y almacenados a 2 °C aplicando un tratamiento con AEO sobre la superficie del filete.

5.4. Conclusiones

La descontaminación de los filetes previa al envasado reduce la carga microbiológica que prolifera durante el almacenamiento de los mismos, aumentando su vida útil en al menos 7 días.

El uso de nuevos sistemas activos antimicrobianos como son: nanoemulsión de aceite esencial de orégano al 0,1% o vapor de aceite esencial de orégano y el uso de temperaturas de almacenamiento de 1 y 2 °C, retrasa el crecimiento de microorganismos (*Enterobacteriaceae* spp., *Pseudomonas* sp., y BAL) hasta los 21 días de almacenamiento. Para los microorganismos AMT y Psicrófilos, estos nuevos sistemas activos antimicrobianos junto con temperaturas de almacenamiento de 1 y 2 °C reducen la carga microbiológica con respecto a los controles.

La aplicación de estas tecnologías como nanoemulsión y/o vapor de aceite esencial de orégano y el uso de temperaturas de almacenamiento de 1 y 2 °C, consigue un menor deterioro y degradación de los filetes de dorada, que se pone de manifiesto por el bajo valor de N-TMA obtenido en estos filetes.

La temperatura de 2 °C es la más adecuada y eficiente para llevar a cabo la conservación de filetes de dorada envasada en MAP ya que contribuye a extender la vida útil de estos productos manteniendo la calidad y seguridad de los alimentos.

El índice QIM confirma que los filetes tratados con nanoemulsión y vapor de AEO mantienen su calidad durante 28 días, lo que supone un aumento importante de la vida útil con respecto a las muestras sin tratar.

La combinación de bajas temperaturas de conservación junto con la aplicación de tecnologías de descontaminación de los productos, incluyendo agentes antimicrobianos naturales, previo a su envasado, ejerce un efecto sinérgico sobre la calidad del producto manteniendo sus características organolépticas de fresca durante mayor tiempo.

CAPÍTULO 6

Desarrollo de un nuevo sistema de descontaminación superficial y envasado MAP para extender la vida útil de filetes de dorada.

CAPITULO 6. DESARROLLO DE UN NUEVO SISTEMA DE DESCONTAMINACIÓN SUPERFICIAL Y ENVASADO MAP PARA EXTENDER LA VIDA ÚTIL DE FILETES DE DORADA.

6.1. Introducción

Los filetes de pescado fresco de acuicultura son un producto listo para cocinar muy valorado por los consumidores debido a su corto tiempo de cocinado y sus beneficiosas propiedades nutritivas, sin embargo, su vida útil durante el almacenamiento refrigerado es relativamente corta debido al efecto de diferentes mecanismos de deterioro, principalmente la degradación microbiológica (Mendes y Gonçalves, 2008; Singh *et al.*, 2016).

El envasado en atmósfera modificada (MAP) es una técnica que puede extender la vida útil de productos alimentarios perecederos como los filetes de pescado. En este sentido, el envasado MAP enriquecido con CO₂ (60% CO₂) extendió la vida útil de filetes de pescado hasta 13-16 días conservados en refrigeración a 2-4 °C (Campus *et al.*, 2011; Parlapani *et al.*, 2014). Además, el incremento en la vida útil de los filetes de pescado envasados en MAP puede incluso aumentarse mediante la combinación de esta técnica con otros agentes antimicrobianos naturales como extractos de plantas (principalmente aceites esenciales; AEs), extractos de algas, etc. (Erkan, 2012; Feng *et al.*, 2017; Mejlholm and Dalgaard, 2002; Miranda *et al.*, 2018; Speranza *et al.*, 2013; Tassou *et al.*, 1996).

El aceite esencial de orégano (AEO) es bastante utilizado en la industria alimentaria debido a su actividad antimicrobiana y antioxidante (Burt, 2004). Además, se ha comprobado su efecto inhibitorio sobre el crecimiento de patógenos y microorganismos alterantes en los alimentos (Rodríguez-García *et al.*, 2016). Mejlholm y Dalgaard (2002) estudiaron el efecto del AEO aplicado de forma directa sobre la superficie de filetes de bacalao y salmón (0,5 mL kg⁻¹) obteniendo una reducción en el crecimiento microbiano durante su conservación en MAP (60:40 CO₂: N₂) a 2 °C y aumentando su vida útil de 11-12 a 21-26 días. Sin embargo, las dosis tan altas de AEs utilizadas en estudios in vivo, pueden conducir al rechazo del producto por el consumidor debido a la generación de sabores desagradables relacionados con los AEs (Burt, 2004; Martínez-Hernández *et al.*, 2017). El envasado MAP incluyendo vapor de AEs o la aplicación de nanoemulsiones de AEs son técnicas alternativas que pueden dar solución a esta problemática.

Las nanoemulsiones permiten aumentar la funcionalidad de los AEs potenciando su efecto antimicrobiano, además de mejorar su estabilidad y viscosidad (McClements and Rao, 2011; Salvia-Trujillo *et al.*, 2014; Solans *et al.*, 2005; Buranasuksombat *et al.*, 2011). En consecuencia, las nanoemulsiones de diferentes AEs han demostrado excelentes efectos de descontaminación en diferentes productos de frutas y verduras (Donsì *et al.*, 2011; Maté *et al.*, 2016). Así, Donsì *et al.* (2011) descubrieron que la aplicación de una nanoemulsión de AEs sobre un zumo de fruta podía retrasar (1 g AEs L^{-1}) o inactivar por completo (5 g AEs L^{-1}) el crecimiento microbiano sin casi afectar su calidad sensorial. Además, Maté *et al.* (2016) reportaron que el crecimiento de *L. monocytogenes*, inoculado en una crema vegetal, se redujo cuando se usó D-limoneno ($0,5 \text{ mM}$) como nanoemulsión.

La aplicación de vapor de AEs en la descontaminación superficial de alimentos puede disminuir las dosis de AEs necesarias para eliminar microorganismos, ya que el vapor de AEs puede llegar de manera más homogénea a toda la superficie de los productos (Seo *et al.*, 2015). Se han realizado estudios sobre la aplicación directa de vapor de AEs en varios productos hortícolas sin afectar la calidad sensorial del producto (Inouye, 2003; Tyagi and Malik, 2012). Además, Cai *et al.* (2015) estudiaron un tratamiento de vapor de AEs en filetes de rodaballo aplicando papel de filtro impregnado en AEs sobre los filetes durante 2 h en un sistema cerrado, seguido de un envasado en condiciones de aire. Sin embargo, el efecto antimicrobiano de los AEs puede optimizarse cuando éstos son aplicados bajo condiciones de vacío, ya que permite una vaporización rápida y una distribución más homogénea de los vapores de AEs sobre la superficie que se vaya a tratar. En ese sentido, se logró extender la vida útil de hierbas culinarias frescas tratadas con vapor de AEs en un sistema de vacuum cooling industrial (capacidad $22,7 \text{ L}$). Este sistema inyecta los AEs permitiendo su vaporización en el interior del mismo (López-Gómez *et al.*, 2019). Siguiendo esta línea de investigación, se desarrolló un innovador sistema de envasado a escala planta piloto para aplicar vapores de AEs en condiciones de alto vacío ($5\text{-}10 \text{ hPa}$) durante el envasado MAP de filetes de pescado.

En el presente estudio se evaluó el efecto de la aplicación de vapor de AEO en condiciones de vacío inmediatamente antes del envasado MAP, así como un tratamiento de descontaminación con nanoemulsión de AEO mediante inmersión de filetes frescos de dorada sobre su calidad y vida útil.

6.2. Plan experimental

Para llevar a cabo estos ensayos se tomaron 45 doradas frescas, recién capturadas, procedentes de acuicultura (suministradas por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo, S.L.) con un peso medio de 600 ± 50 g por individuo.

Las doradas frescas se separaron en cuatro grupos correspondientes a los tratamientos de descontaminación. Los procesos descabezado y fileteado, así como la aplicación de los tratamientos de descontaminación se realizaron en una cabina de flujo laminar (clase 100) ubicada en el interior de una sala blanca (clase 10,000) a 8 °C.

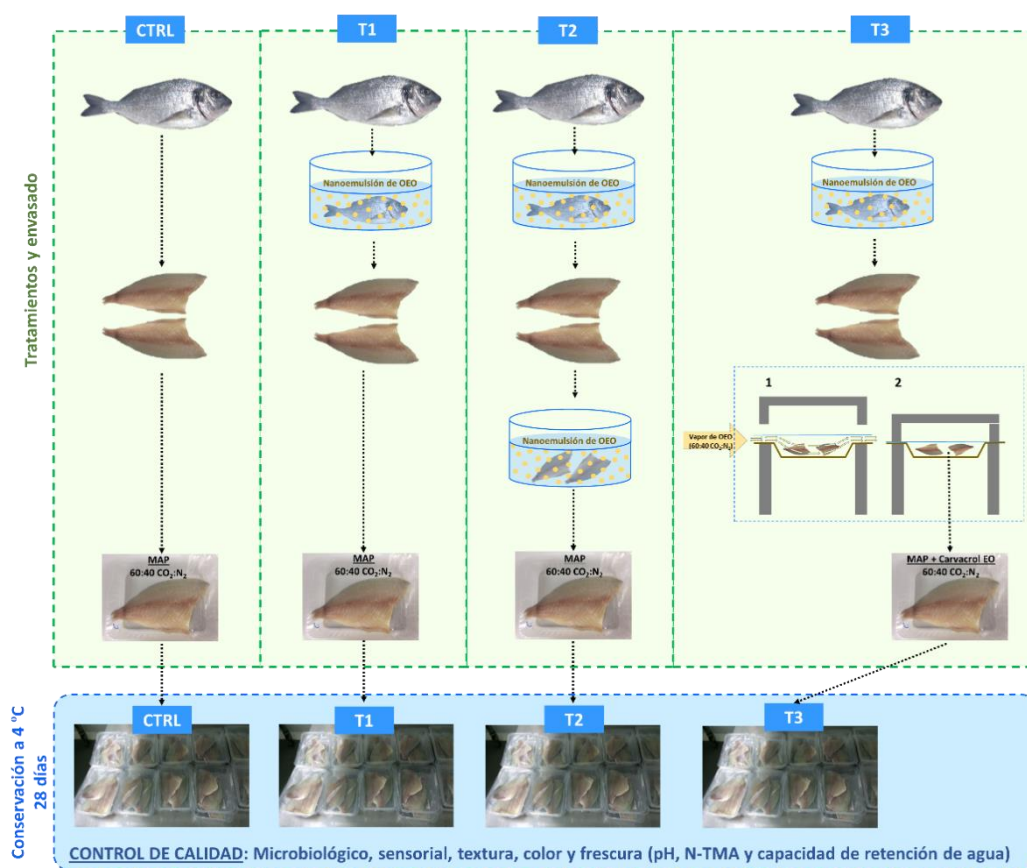


Figura 6.1. Plan experimental para el estudio de determinación de vida útil de filetes de dorada aplicando distintas tecnologías de descontaminación y envasado MAP.

Los tratamientos de descontaminación que se realizaron se estructuran de la siguiente manera:

- **CTRL:** el pescado entero no tratado (sin descontaminación previa al envasado) fue descabezado y fileteado.
- **T1:** el pescado entero fue descontaminado con una solución fría (4 °C) de nanemulsión de AEs al 0,1% mediante inmersión del individuo durante 30 segundos. Posteriormente, fue descabezado y fileteado.
- **T2:** el pescado entero fue descontaminado con una solución fría (4 °C) de nanemulsión de AEs al 0,1% mediante inmersión del individuo durante 30 segundos. Posteriormente, fue descabezado y fileteado. Los filetes fueron también descontaminados mediante su inmersión en una solución de nanoemulsión de AEs al 0,1% a 4 °C durante 2 minutos. El tiempo de inmersión de 2 minutos para los filetes se seleccionó en base a experimentos previos para asegurar una descontaminación microbiana adecuada sin afectar la aceptación sensorial de las muestras.
- **T3:** el pescado entero fue descontaminado con una solución fría (4 °C) de nanemulsión de AEs al 0,1% mediante inmersión del individuo durante 30 segundos. Posteriormente, fue descabezado y fileteado. Los filetes se envasaron en MAP con inyección de vapor de AEO ($67 \mu\text{L L}^{-1}$) y bajo una combinación gasAESA de 60% CO₂:40% N₂. El envasado de los filetes aplicando vapor de AEO se realizó en una termoselladora patentada por nuestro grupo de investigación (Figura 6.2), capaz de inyectar vapor de AEs durante el envasado a través de su vaporización en condiciones de vacío (5-10 hPa). El envase se termoselló automáticamente en el mismo equipo utilizando un film Cryovac® EOP616B (39 μm de espesor; Cryovac, Fuenlabrada, Madrid). La concentración de vapor de AEO se seleccionó en base a experimentos preliminares con filetes de pescado analizando la cantidad máxima de AEO que no transfirió olores y/o sabores desagradables al producto. La mezcla de gases fue seleccionada como la más apropiada para extender la vida útil de dorada, basada en evaluaciones sensoriales según Campus *et al.* (2011).

El envasado MAP de las muestras de los tratamientos CTRL, T1 y T2 se realizó usando la misma termoselladora y la misma combinación de gases como se describe en el tratamiento T3, pero sin inyección de AEO.

Los filetes (≈ 95 g por filete) necesarios para cada uno de los tratamientos ensayados se envasaron en bandejas de polipropileno (PP) de 0,75 L de capacidad (2 filetes por bandeja) y se almacenaron en refrigeración a 4 °C. Las muestras se analizaron los días 0, 7, 12, 21 y 28, tomando 3 bandejas por tratamiento y día de muestreo para realizar las determinaciones microbiológicas, físico-químicas y sensoriales, cuyos resultados se detallan a continuación. La temperatura de 4 °C ha sido seleccionada como la temperatura comercial más desfavorable que se utiliza en la mayoría de tiendas de alimentación, siendo la temperatura adecuada de 2 °C.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Análisis microbiológicos

Los resultados de los análisis microbiológicos llevados a cabo en este ensayo se muestran en las Figuras 6.2. y 6.3.

La carga inicial de microorganismos psicrófilos, enterobacterias y *Pseudomonas sp.* de todas las muestras estaban por debajo del límite de detección (1 log UFC/g). En cambio, los recuentos de aerobios mesófilos (AMT) y BAL iniciales del tratamiento CTRL fueron de 2,95 y 1,54 log UFC/g, respectivamente. La calidad microbiológica se utiliza en la industria como una herramienta útil para la evaluación de la vida útil de los productos pesqueros (Huss *et al.*, 1995).

La carga de *Enterobacteriaceae spp.* indica buenas prácticas de pesca y manejo, junto con una buena higiene del medio marino donde se capturan los peces. *Pseudomonas sp.* es un grupo de bacterias responsable e indicador del deterioro del pescado fresco (Stamatis and Arkoudelos, 2007). En general, los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos y psicrófilos son una herramienta valiosa para la evaluación de la calidad y la determinación de la vida útil del pescado fresco durante su almacenamiento en refrigeración (Huss *et al.*, 1995). La baja carga inicial de estos microorganismos observada en los filetes de dorada indica buena calidad del pescado y buenas prácticas de manejo.

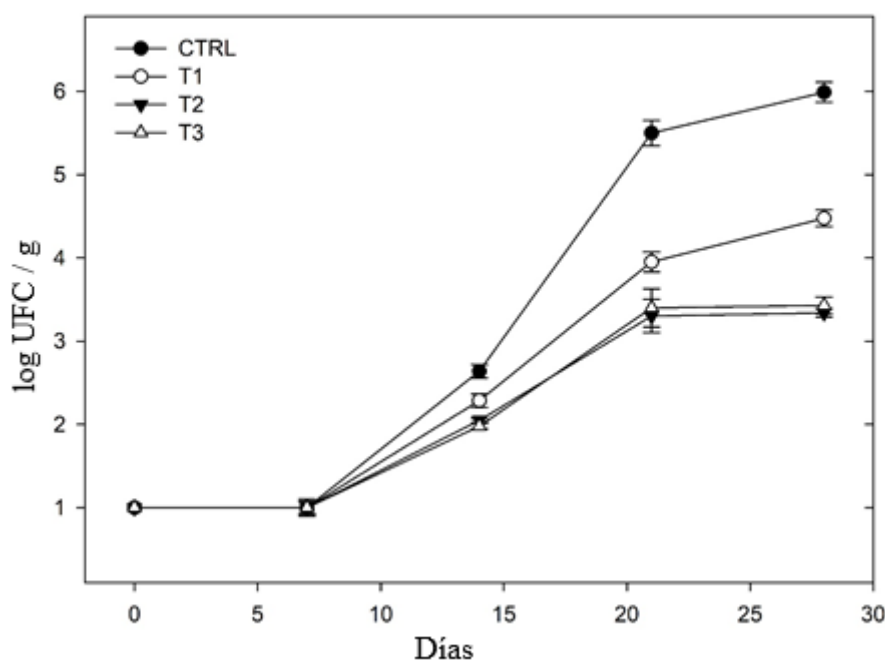


Figura 6.2. Evolución del crecimiento de *Enterobacteriaceae spp.* en filetes de dorada envasados en MAP durante su conservación a 4 °C ($n=3\pm SD$). Muestras no tratadas (CTRL, ○); tratamiento T1: descontaminación del pescado entero por inmersión con nanoemulsión de AEO (T1, ■), tratamiento T2: T1+inmersión de los filetes en nanoemulsión con AEO (T2, ▲); tratamiento T3: filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (T3, ×).

La descontaminación de toda la superficie del pescado con nanoemulsión de AEO (T1) redujo ($p < 0,05$) los mesófilos (AMT) y el crecimiento de las BAL en 1 y 0,6 unidades logarítmicas en el día inicial, respectivamente, con respecto a las muestras CTRL. De manera similar, la inmersión en emulsión de carvacrol (el componente principal de AEO) (1%; 30 s) de filetes de bacalao mostró una mayor reducción en la carga de microorganismos mesófilos que de BAL cuando se comparó con las muestras de control (sumergidas en agua destilada) (Smyth *et al.*, 2018). La descontaminación adicional de los filetes de dorada (T2) con nanoemulsión de AEO no obtuvo una reducción microbiana significativa ($p > 0,05$) para ninguno de los microorganismos estudiados en comparación con T1 en el día inicial. Este efecto puede explicarse debido a que los residuos de AEs sobre la superficie del pescado tras la aplicación del T1, pueden transferirse al músculo del pescado durante el fileteado, y evitar así que cualquier tratamiento posterior (T2) afecte a los microorganismos presentes en los filetes de pescado.

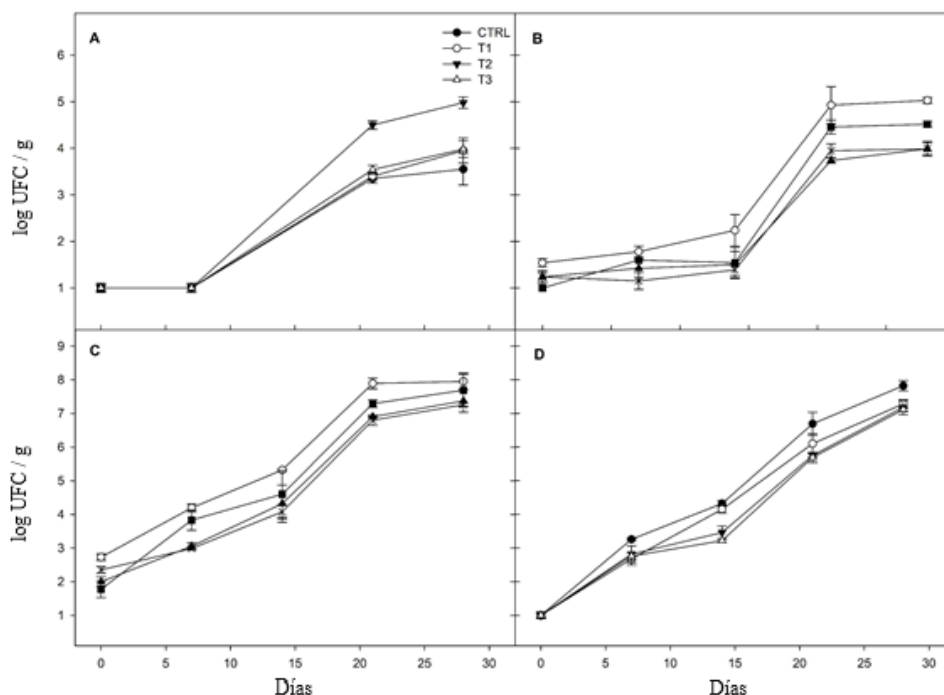


Figura 6.3. Carga microbiana de *Pseudomonas* sp. (A), bacterias ácido lácticas (B), aerobios mesófilos (C) y psicrófilos totales (D) en los filetes de dorada envasados en MAP durante su conservación a 4 °C ($n=3\pm SD$). Muestras no tratadas (CTRL, \circ); tratamiento T1: descontaminación del pescado entero por inmersión con nanoemulsión de AEO (T1, \blacksquare); tratamiento T2: T1+inmersión de los filetes en nanoemulsión con AEO (T2, \blacktriangle); tratamiento T3: filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (T3, \times).

El tiempo de conservación como factor fue significativo ($p < 0,05$) para todos los microorganismos alterantes, así como la interacción tratamiento \times tiempo de almacenamiento. El crecimiento microbiano de las muestras aumentó de manera exponencial (para todos los grupos microbianos) del día 7 al día 21 seguido de un crecimiento más estable en los últimos 7 días de almacenamiento. Por otro lado, los microorganismos psicrófilos mostraron un crecimiento constante durante todo el período de almacenamiento explicado por la temperatura de refrigeración, factor positivo para este grupo microbiano. Con respecto a los aerobios mesófilos, T2 y T3 registraron recuentos con aproximadamente 1,2 / 0,8 (día 7) y 1 / 0,5 (día 21) log UFC/g por debajo de los obtenidos por las muestras CTRL y T1, durante el almacenamiento. Las muestras T2 y T3 también mostraron recuentos menores para BAL y *Enterobacteriaceae spp.* durante el período de conservación.

En el día 28 de conservación, las muestras de los tratamientos T2 y T3 obtuvieron 2,6 y 1 logaritmos menos de enterobacterias y BAL, respectivamente, que las muestras CTRL. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los recuentos de

T2 y T3 para mesófilos, BAL o enterobacterias durante el almacenamiento. Si observamos el comportamiento de *Pseudomonas sp.* y microorganismos psicrófilos, éstos no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos T1, T2 y T3, en comparación con las muestras CTRL durante todo el período de conservación. Una explicación factible para este hecho puede ser la mayor resistencia de *Pseudomonas* a los AEs en comparación con otros microorganismos (mesófilos, psicrófilos, *Shewanella putrefaciens* y *Photobacterium phosphoreum*) (Speranza *et al.*, 2013); y un mayor efecto bacteriostático sobre los microorganismos psicrófilos, provocado por la baja temperatura de conservación, en lugar del que hayan podido ejercer los AEs como antimicrobianos.

Hacia el final del período de conservación, el crecimiento de microorganismos mesófilos de los tratamientos T2 y T3 no superaron las 7 unidades logarítmicas, nivel considerado como límite máximo de crecimiento microbiano para la aceptabilidad en productos pesqueros (ICMSF, 1986). En contraste, el tratamiento T1 fue suficiente para controlar (<7 unidades logarítmicas) el desarrollo de microorganismos psicrófilos tras 28 días, con valores similares a las muestras T2 y T3, mientras que CTRL superó este límite microbiano. El recuento del resto de microorganismos analizados, mostraron cargas inferiores a 5 unidades de logarítmicas durante el almacenamiento, independientemente del tratamiento. De manera similar, la aplicación directa de AEO en filetes de bacalao (0.5 mL kg^{-1}) extendió la vida útil del producto de 11-12 días a 21-26 días bajo MAP (60:40 CO_2 : N_2) a 2°C (Mejlholm and Dalgaard, 2002).

Se puede concluir que la descontaminación superficial de los filetes de dorada con el nuevo sistema de envasado MAP en combinación con vapores de AEO (T3) obtuvo resultados similares a la descontaminación por inmersión con nanoemulsión de AEO (T2). Además, la vida útil de los filetes de dorada se extendió a 28 días a 4°C , en función de la calidad microbiana, mientras que los filetes no tratados (T1 y CTRL) obtuvo una vida útil inferior a 21 días.

Según los resultados obtenidos, la aplicación de vapor de AEO combinado con el envasado en MAP alcanzaría una vida útil similar a la mostrada por las descontaminaciones realizadas mediante inmersión de alimentos en nanoemulsiones de AEs convencionales sin el riesgo microbiano de contaminaciones cruzadas.

6.3.2. Análisis físico-químicos

• Determinación del pH

El valor inicial de pH de las muestras osciló entre 6,32 y 6,52 (Tabla 6.1.). Sin embargo, otros autores reportaron valores de pH más bajos en filetes de dorada (İzci *et al.*, 2018). Estas diferencias de pH pueden explicarse en base a la variación de los factores que rodean los peces como el área de crecimiento, estación, alimentación, entre otros (Hebard *et al.*, 1982).

Tabla 6.1. Evolución del parámetro pH durante la conservación de filetes de dorada a 4 °C, CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).

Tratamiento	Período de conservación (días)				
	0	7	14	21	28
CTRL	6,52±0,01 ^{Aa}	6,32±0,02 ^{Ab}	6,43±0,01 ^{Ab}	6,47±0,07 ^{Ab}	6,42±0,04 ^{Ab}
T1	6,36±0,05 ^{ABa}	6,38±0,01 ^{Aa}	6,37±0,01 ^{Aa}	6,36±0,02 ^{Aa}	6,31±0,03 ^{Aa}
T2	6,32±0,03 ^{Ba}	6,30±0,04 ^{Aa}	6,29±0,02 ^{Aa}	6,34±0,01 ^{Aa}	6,37±0,04 ^{Aa}
T3	6,40±0,01 ^{ABa}	6,40±0,03 ^{Aa}	6,41±0,02 ^{Aa}	6,43±0,03 ^{Aa}	6,35±0,01 ^{Aa}

Ns: diferencias no significativas (p>0,05). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

El pH del pescado es un indicador importante de calidad fisicoquímica. Los incrementos de este parámetro en el músculo del pescado durante su almacenamiento pueden atribuirse al crecimiento de bacterias alterantes y a la acumulación de compuestos alcalinos, como los compuestos de amoníaco (es decir, TMA) (Özyurt *et al.*, 2012). Las muestras del tratamiento CTRL mostraron un pH más alto que el resto de las muestras, lo que se correlaciona a su vez con un mayor contenido del compuesto alcalino N-TMA. Por otro lado, las muestras del T2 mostraron un pH más bajo en comparación con las del CTRL, lo que puede ser debido al efecto del AEs sobre el pH de los filetes cuando éstos se sumergieron en la nanoemulsión de AEO. Sin embargo, el pH de las muestras CTRL se redujo ligeramente en 0,2 unidades después de 7 días.

La acidificación del músculo del pescado puede ser debido a que el CO₂ existente en el envase MAP del pescado puede ser absorbido por la superficie del músculo formando ácido carbónico (Banks *et al.*, 1980). De esta manera, autores reportaron que el pH de los

filetes de caballa envasados en MAP (50:50 CO₂: N₂) también se redujo en 0,2 unidades después de 15 días a 3 °C, mientras que el pH de las muestras envasadas bajo condiciones de aire aumentó en 0,9 unidades (Stamatis & Arkoudelos, 2007). Por el contrario, las muestras de los tratamientos T1, T2 y T3 no mostraron cambios significativos de pH en el día 7 como se observó para las muestras CTRL. Esta fluctuación puede explicarse por un menor crecimiento de las BAL en las muestras tratadas con AEO. Esta disminución en el crecimiento bacteriano genera menor formación de ácido láctico y contrarresta los valores de pH por la acidificación relacionada con el CO₂.

- ***Capacidad de retención de agua del músculo (CRA)***

La capacidad del músculo del pescado para retener agua, es decir CRA, se considera un parámetro de calidad básico de gran importancia para la industria y el consumidor (Álvarez *et al.*, 2012). Varios parámetros se han asociado con valores bajos de CRA, como pH, temperatura, desprendimiento de sarcolema, huecos en la matriz extracelular, ensanchamiento del espacio intermiofibrilar y contracción transversal de la fibra muscular (Ofstad *et al.*, 1995; Olsson *et al.*, 2003a; Olsson *et al.*, 2003b). Sin embargo, el tratamiento, el tiempo de almacenamiento y su interacción no mostraron un efecto significativo ($p > 0,05$) en el contenido de CRA de las muestras (datos no mostrados).

Aunque se han relacionado valores de pH bajos con una baja CRA del músculo de pescado (Ofstad *et al.*, 1996), dicha correlación negativa de CRA-pH no se observó en los filetes de dorada (Attouchi & Sadok, 2010), lo que corrobora la importancia del efecto multifactor del entorno del pez.

Se espera que la CRA de los filetes de pescado disminuya durante el almacenamiento. Álvarez *et al.* (2012) registraron una disminución de la CRA de 3,5 unidades en filetes de dorada almacenados en hielo durante 21 días a 4 °C. Sin embargo, cuando los filetes de pescado se almacenaron envueltos en una película delgada de polietileno, no se observaron cambios de CRA después de 18 días a 4 °C (Hernández *et al.*, 2009). Además, el envasado en MAP (40:30:30 CO₂: N₂: O₂) de filetes de dorada no afectó a la CRA tras 14 días a 3 °C (Garrido *et al.*, 2016).

En consecuencia, si la CRA de las muestras no experimenta cambios durante su período de conservación podría explicarse debido a que la atmósfera del envasado MAP limita la pérdida de agua retenida en el músculo del pescado.

- ***Determinación de Color***

Los parámetros de color de los filetes de dorada durante el almacenamiento se muestran en la Tabla 6.2. No se observaron diferencias significativas de L^* , a^* y b^* entre los tratamientos en el día inicial (día de procesado).

En general, el valor L^* aumentó durante la conservación alcanzando valores de 50,31-53,48 tras 28 días, sin diferencias significativas entre los tratamientos. Tal incremento de L^* se ha relacionado con depósitos de agua más altos en la superficie del filete de pescado (Hernández *et al.*, 2009), como resultado del aumento de la condensación líquida del vapor de agua retenido dentro de la atmósfera MAP. El enrojecimiento (a^*) del tratamiento CTRL mostró una disminución continua durante el almacenamiento, mientras que para los T1 y T3 se observó un aumento inicial seguido de una disminución. La amarillez (b^*) de las muestras aumentó durante el almacenamiento. Se ha sugerido que estos cambios de color se deben a la oxidación de proteínas con grupos hemo, como la hemoglobina y la mioglobina (Masniyom *et al.*, 2005). Además, se ha comprobado que b^* es el principal parámetro involucrado en los cambios de color de los filetes de dorada, lo que indica una tendencia hacia un tono más amarillento durante el almacenamiento (Álvarez *et al.*, 2012). Después de 7 días, las muestras tratadas con AEO mostraron un amarillamiento más bajo que las muestras CTRL. Sin embargo, la amarillez aumentó en mayor grado para las muestras tratadas (T1, T2 y T3) desde el día 7 hasta el final del almacenamiento. Particularmente, las muestras T3 mostraron los valores más altos de b^* después de 28 días, seguidos de T1 y T2 (sin diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ellos). De manera similar a la textura, el color tampoco se ha de seleccionar como un buen indicador del deterioro del filete de pescado, aunque estos parámetros se pueden usar en ciertos momentos para respaldar los datos obtenidos por métodos fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales (Hernández *et al.*, 2009).

Tabla 6.2. Resultados obtenidos de los parámetros de color en filetes de dorada durante su período de conservación a 4 °C; CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).

		Tiempo de conservación (días)				
Tratamiento		0	7	14	21	28
L*	CTRL	43,66±0,22 ^{ABc}	47,17±0,31 ^{Ab}	47,97±0,83 ^{Aab}	48,94±1,09 ^{Aab}	50,28±1,62 ^{Aa}
	T1	41,83±0,69 ^{Bc}	45,09±0,09 ^{Bb}	46,04±0,41 ^{ABb}	46,20±0,23 ^{Bb}	52,76±0,95 ^{Aa}
	T2	43,82±0,99 ^{Ac}	46,46±0,87 ^{ABb}	46,79±0,35 ^{Ab}	47,01±0,56 ^{ABb}	50,31±0,73 ^{Aa}
	T3	43,61±0,79 ^{ABbc}	41,89±0,11 ^{Cc}	43,91±0,92 ^{Bb}	45,58±1,02 ^{Bb}	53,08±0,49 ^{Aa}
a*	CTRL	3,68±0,10 ^{Aa}	3,65±0,16 ^{Aa}	2,68±0,23 ^{Ab}	1,19±0,26 ^{Bb}	1,05±0,31 ^{Cb}
	T1	2,40±0,14 ^{Bb}	3,09±0,25 ^{ABa}	2,42±0,17 ^{Ab}	1,60±0,29 ^{Bc}	1,43±0,32 ^{BCc}
	T2	2,58±0,36 ^{Bab}	3,17±0,46 ^{ABa}	2,52±0,18 ^{Aab}	2,31±0,09 ^{Aab}	2,28±0,32 ^{Ab}
	T3	1,80±0,18 ^{Ca}	2,53±0,32 ^{Bab}	2,51±0,28 ^{Aab}	2,77±0,18 ^{Aa}	2,09±0,15 ^{ABbc}
b*	CTRL	-2,90±0,12 ^{Abc}	-3,07±0,20 ^{Ac}	-2,87±0,10 ^{Aab}	-2,21±0,01 ^{Cab}	-1,72±0,54 ^{Ca}
	T1	-3,40±0,03 ^{Bc}	-3,49±0,42 ^{Ac}	-2,53±0,11 ^{Ab}	-2,02±0,10 ^{Cb}	1,08±0,14 ^{Ba}
	T2	-4,06±0,32 ^{Cc}	-3,48±0,22 ^{Ac}	-1,66±0,16 ^{Bb}	-0,81±0,40 ^{Bb}	0,29±0,03 ^{Ba}
	T3	-4,14±0,13 ^{Cd}	-3,53±0,44 ^{Ad}	-0,80±0,17 ^{Cc}	-0,16±0,08 ^{Ab}	3,69±0,26 ^{Aa}

Ns: diferencias no significativas (p>0,05). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

- ***Análisis de perfil de textura (TPA)***

La textura se considera un rasgo de calidad importante relacionado con la calidad del músculo de los peces (Ayala *et al.*, 2010). Los tratamientos con AEO no afectaron ($p > 0,05$) los parámetros texturales iniciales de las muestras (Tabla 6.3.). Del mismo modo, otros autores que realizaron diferentes tratamientos de AEs (orégano, tomillo, romero, laurel, laurel, semilla negra, salvia, semilla de uva, linaza y limón) (0,05-1%) no observaron modificaciones en los valores de textura iniciales para filetes de pescado (Mejlholm and Dalgaard, 2002; Erkan and Bilen, 2010; Erkan *et al.*, 2011).

Sin embargo, todos los parámetros de textura, excepto la elasticidad, se vieron significativamente afectados ($p < 0,05$) durante el almacenamiento de los filetes de dorada. Dichas reducciones de textura fueron particularmente altas en los primeros 7 días de almacenamiento, especialmente en la dureza, gomosidad, adhesividad y masticabilidad. En las etapas de almacenamiento posteriores, los cambios de textura fueron mínimos hasta el final de su conservación, siendo no significativos ($p > 0,05$) en la mayoría de los casos, en comparación con los datos del día 7. Por el contrario, la cohesión se vio menos afectada durante todo el período de almacenamiento con reducciones inferiores a 0,08 unidades después de 28 días. La degradación del tejido muscular durante el almacenamiento de la dorada se asocia principalmente al desprendimiento de miofibras al sarcolema, lo que causa una pérdida de adhesión interfibrilar (Ayala *et al.*, 2010; Delbarre-Ladrat *et al.*, 2006; Taylor *et al.*, 2002). De acuerdo con nuestros resultados, la textura de los filetes de dorada cambió en la primera etapa de almacenamiento (5-10 días; 4 °C), y se correlacionó con la pérdida de adhesión fibra a fibra (determinada por microscopía óptica) (Ayala *et al.*, 2010). Sin embargo, esos autores informaron que los parámetros de textura de los filetes de dorada no se modificaron durante el almacenamiento posterior (22 días), mientras que el porcentaje de desprendimiento entre las fibras aumentó (Ayala *et al.*, 2010). Se ha sugerido que cuando el tejido muscular alcanza un umbral de deterioro específico, se puede alcanzar un límite y, por lo tanto, no se pueden detectar instrumentalmente diferencias de textura (Ayala *et al.*, 2010; Bahuaud *et al.*, 2008).

Atendiendo a los tratamientos, se observaron las mayores disminuciones de los parámetros de textura durante la etapa de almacenamiento inicial (7 días) en las muestras T2, siendo los valores iniciales de dureza, gomosidad y masticabilidad reducidos en 2,9;

2,5 y 3 unidades, respectivamente. La dureza y la viscosidad de las muestras CTRL también mostraron reducciones similares ($p > 0,05$) a las muestras del T2 en esta primera etapa de 7 días. El T3 mostró los cambios texturales más bajos en dicha etapa de almacenamiento inicial, al igual que el T1. Aunque las muestras del T2 mostraron una tendencia consistente en los valores más altos de dureza y masticabilidad después de 28 días, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos para ninguno de los parámetros de textura estudiados. Esta alta variabilidad en la textura medida en las muestras, que conduce a diferencias no significativas, puede explicarse ya que la degradación del tejido muscular no es homogénea entre las muestras de la misma etapa, ni entre las diferentes zonas de la misma muestra, como observó Ayala *et al.* (2010) por microscopía óptica. En ese sentido, las mediciones de textura no parecían un buen indicador del deterioro durante el almacenamiento del filete de dorada, como se encontró previamente (Ayala *et al.*, 2010), ya que se estableció una vida útil clara de al menos 28 días de acuerdo con QIM al aplicar los tratamientos con AEO T2 y T3.

Tabla 6.3. Resultados del análisis de perfil de textura de filetes de dorada durante su período de conservación a 4 °C. CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).

	Tratamiento	Tiempo de conservación (días)				
		0	7	14	21	28
Dureza (N)	CTRL	19,41±4,17 ^{Aa}	7,82±2,17 ^{Ab}	6,83±0,42 ^{Ab}	6,99±0,90 ^{Ab}	7,40±1,25 ^{Ab}
	T1	15,83±5,38 ^{Aa}	6,76±2,66 ^{Ab}	8,40±1,08 ^{Aab}	7,85±1,94 ^{Aab}	9,44±0,88 ^{Aab}
	T2	14,96±3,71 ^{Aa}	5,10±2,17 ^{Ab}	6,50±0,87 ^{Ab}	9,03±1,06 ^{Ab}	8,69±0,94 ^{Ab}
	T3	11,56±3,52 ^{Aa}	5,56±1,29 ^{Ab}	6,37±0,50 ^{Ab}	9,13±1,37 ^{Aab}	7,72±2,24 ^{Aab}
Gomosidad (N)	CTRL	5,59±1,65 ^{Aa}	2,13±0,65 ^{Ab}	1,95±0,22 ^{Ab}	1,83±0,45 ^{Ab}	2,23±0,61 ^{Ab}
	T1	4,06±2,12 ^{Aa}	2,17±0,57 ^{Ab}	2,38±0,34 ^{Ab}	1,85±0,62 ^{Ab}	2,05±0,29 ^{Ab}
	T2	5,03±1,51 ^{Aa}	2,04±1,15 ^{Ab}	2,30±0,68 ^{Ab}	2,68±0,46 ^{Ab}	2,45±0,35 ^{Ab}
	T3	2,60±1,05 ^{Aa}	1,95±0,46 ^{Aa}	2,16±0,61 ^{Aa}	3,03±0,84 ^{Aa}	2,09±0,83 ^{Aa}
Adhesividad (N s)	CTRL	-0,37±0,03 ^{Ab}	-0,40±0,17 ^{Ab}	-0,49±0,09 ^{Aab}	-0,54±0,05 ^{Aab}	-0,65±0,09 ^{Aa}
	T1	-0,57±0,02 ^{ABa}	-0,48±0,07 ^{Aa}	-0,52±0,05 ^{Aa}	-0,56±0,05 ^{Aa}	-0,67±0,03 ^{Ab}
	T2	-0,42±0,05 ^{BCa}	-0,45±0,08 ^{Aa}	-0,47±0,05 ^{Aa}	-0,67±0,09 ^{Ab}	-0,66±0,05 ^{Ab}
	T3	-0,56±0,11 ^{Ca}	-0,52±0,07 ^{Aa}	-0,60±0,02 ^{Aa}	-0,65±0,04 ^{Aa}	-0,64±0,09 ^{Aa}
Cohesividad	CTRL	0,30±0,04 ^{Aa}	0,30±0,01 ^{Aa}	0,28±0,02 ^{Aa}	0,25±0,04 ^{Aa}	0,27±0,01 ^{Aa}
	T1	0,30±0,03 ^{Aa}	0,32±0,03 ^{Aa}	0,21±0,02 ^{Bb}	0,22±0,03 ^{ABb}	0,22±0,03 ^{Ab}
	T2	0,30±0,01 ^{Aa}	0,32±0,06 ^{Aa}	0,28±0,02 ^{Aa}	0,29±0,02 ^{ABa}	0,29±0,04 ^{Aa}
	T3	0,26±0,01 ^{Ab}	0,33±0,04 ^{Aa}	0,28±0,02 ^{Ab}	0,28±0,02 ^{Bab}	0,24±0,04 ^{Ab}

Masticabilidad (N mm)	CTRL	1,89±0,76 ^{Aa}	0,73±0,23 ^{Ab}	0,70±0,12 ^{Ab}	0,60±0,17 ^{Ab}	0,64±0,24 ^{Ab}
	T1	1,20±0,29 ^{Aa}	0,80±0,31 ^{Aa}	0,81±0,10 ^{Aa}	0,60±0,20 ^{Aa}	0,71±0,04 ^{Aa}
	T2	1,71±0,61 ^{Aa}	0,57±0,29 ^{Ab}	0,70±0,09 ^{Ab}	0,74±0,06 ^{Ab}	0,75±0,24 ^{Ab}
	T3	0,73±0,36 ^{Aa}	0,59±0,17 ^{Aa}	0,74±0,08 ^{Aa}	0,87±0,31 ^{Aa}	0,64±0,31 ^{Aa}
Elasticidad (mm)	CTRL	0,32±0,03 ^{Aa}	0,34±0,01 ^{ABa}	0,32±0,02 ^{Aa}	0,33±0,02 ^{Aa}	0,30±0,05 ^{Aa}
	T1	0,33±0,06 ^{Aa}	0,36±0,06 ^{Aa}	0,34±0,04 ^{Aa}	0,32±0,01 ^{Aa}	0,35±0,03 ^{Aa}
	T2	0,34±0,02 ^{Aa}	0,28±0,01 ^{Ba}	0,32±0,02 ^{Aa}	0,28±0,02 ^{Aa}	0,32±0,06 ^{Aa}
	T3	0,27±0,03 ^{Aa}	0,30±0,02 ^{ABa}	0,30±0,01 ^{Aa}	0,29±0,03 ^{Aa}	0,30±0,04 ^{Aa}

Ns: diferencias no significativas ($p > 0,05$). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

• **Nitrógeno de Trimetilamina (N-TMA)**

Los filetes de pescado mostraron un contenido inicial de N-TMA de 2,6 mg kg⁻¹ (Tabla 6.4.). N-TMA es un índice bioquímico utilizado para evaluar la frescura del pescado. La TMA, que se forma a partir del óxido de trietilamina debido a la actividad enzimática bacteriana, es el principal componente responsable del desagradable olor a "pescado" (Connell, 1995; Ólafsdóttir *et al.*, 1997).

Tabla 6.4. Evolución del contenido de N-TMA en filetes de dorada durante su conservación a 4°C. CTRL: muestras no tratadas; T1: inmersión en nanoemulsión de AEO de la dorada entera; T2: T1+inmersión en nanoemulsión de AEO de los filetes de dorada; T3: aplicación de vapor de AEO en el envasado MAP (n=3±SD).

Tratamiento	Tiempo de conservación (días)				
	0	7	14	21	28
CTRL	2.6±0.2 ^{Ac}	5.9±0.1 ^{Abc}	8.4±0.4 ^{Ab}	12.4±1.4 ^{Aab}	19.4±3.1 ^{Aa}
T1	1.6±0.2 ^{Bd}	2.9±0.2 ^{Bd}	4.8±0.4 ^{Bc}	6.5±0.4 ^{Bb}	9.8±0.5 ^{Ba}
T2	0.9±0.1 ^{Cd}	1.7±0.4 ^{Cd}	3.2±0.4 ^{Ac}	4.9±0.4 ^{Bb}	6.9±0.4 ^{Ba}
T3	0.5±0.1 ^{Cd}	1.2±0.4 ^{Ccd}	3.0±0.4 ^{Ac}	5.1±0.5 ^{Bb}	7.6±0.1 ^{Ba}

Ns: diferencias no significativas (p>0,05). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

El bajo contenido inicial de N-TMA se correlacionó con pescado fresco y está en concordancia con los valores de N-TMA obtenidos en filetes de dorada (3-4 mg kg⁻¹) reportados por (Goulas & Kontominas, 2007; Tejada & Huidobro, 2002). Las muestras de los tratamientos con AEO T1, T2 y T3 obtuvieron una reducción inicial de N-TMA de 1,0; 1,8 y 2,2 mg kg⁻¹, respectivamente, en comparación con los filetes CTRL. El efecto protector del AEO contra la producción de N-TMA se debe a las propiedades antibacterianas que tienen los compuestos fenólicos de los AEs. Este efecto se mantuvo durante todo el período de conservación, reduciendo la formación de N-TMA de 19,5 mg kg⁻¹ (muestras CTRL) a 7-10 mg kg⁻¹ en muestras T1, T2 y T3 después de 28 días. Entre los tratamientos con AEO no se observaron diferencias significativas (p> 0,05). De manera similar, los AEs de orégano y canela aplicados en filetes de pescado redujeron la formación de N-TMA durante el almacenamiento (Goulas and Kontominas, 2007; Ojagh *et al.*, 2010).

Muchos son los estudios que han relacionado el límite de aceptabilidad del pescado con los valores del N-TMA durante su conservación, pero el rango de valores para determinar pescado fresco y deteriorado es muy variable. En ese sentido, Goulas y Kontominas (2007) propusieron un límite de N-TMA más realista para los filetes de dorada de 20-30 mg kg⁻¹ en función de los contenidos de N-TMA y las puntuaciones de los atributos sensoriales. El contenido de N-TMA de las muestras de los tratamientos T1, T2 y T3 tras 28 días (6,9-9,8 mg kg⁻¹) estaban por debajo del límite N-TMA propuesto por Goulas y Kontominas (2007), al contrario de las muestras CTRL.

6.3.3. Evaluación sensorial

El QIM está recomendado por los institutos de investigación de peces en Europa como un método sensorial rápido y objetivo, con el interés de estandarizar y armonizar la evaluación sensorial del pescado (Martinsdottir *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos de la evaluación sensorial QIM de los filetes de pescado durante el almacenamiento se muestran en la Figura 6.4.

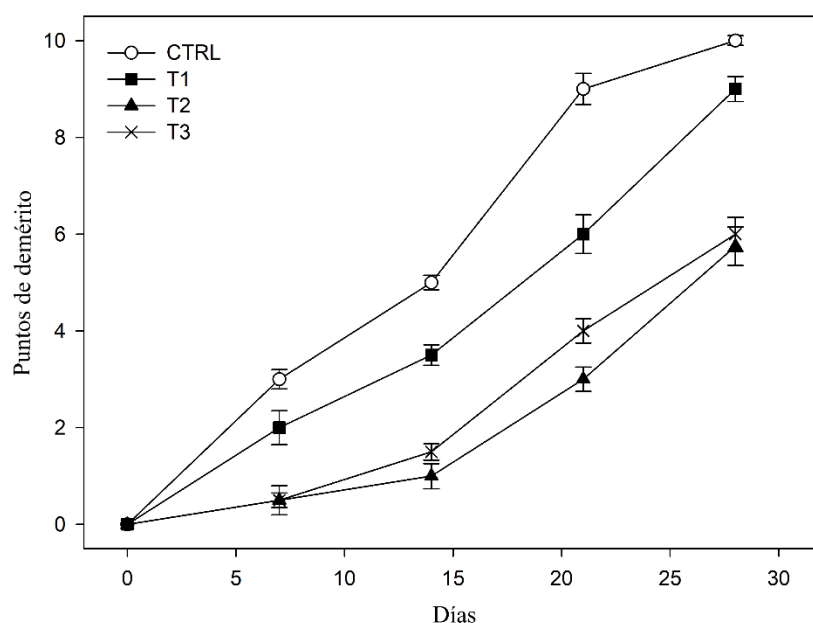


Figura 6.4. Puntuaciones QIM de filetes de dorada envasadas en MAP durante el almacenamiento a 4 °C (n=3±SD). Muestras no tratadas (CTRL, ○); tratamiento T1: descontaminación del pescado entero por inmersión con nanoemulsión de AEO (T1, ■); tratamiento T2: T1+inmersión de los filetes en nanoemulsión con AEO (T2, ▲); tratamiento T3: filetes envasados en MAP con aplicación de vapores de AEO (T3, ×).

La calidad sensorial se vio menos afectada durante los primeros 7 días de conservación. Se observó una mayor tasa de degradación en el pescado desde el día 7 hasta el final del período de almacenamiento.

Los panelistas rechazaron las muestras CTRL cuando la puntuación por deméritos era superior a 6, de manera similar a Giarratana *et al.* (2016). Particularmente, el sabor y el olor determinaron el punto de rechazo de las muestras cocinadas en un umbral QIM (Huidobro *et al.*, 2000). Las muestras de los tratamientos T2 y T3 mostraron los valores más bajos durante todo el período de almacenamiento, mientras que los valores más altos pertenecen a los filetes del CTRL seguidos por el T1. En particular, el límite de aceptabilidad para CTRL y T1 se superó el día 21, mientras que los filetes de los T2 y T3 aún se aceptaron tras 28 días. Del mismo modo, no aparecieron sabores ni olores desagradables relacionados con los AEs en los filetes de dorada ($1 \mu\text{L g}^{-1}$) aplicando un tratamiento con limoneno (0,8-1,2%) después de 15 días a 2 °C (envasado al vacío) (Giarratana *et al.*, 2016). Mejlholm y Dalgaard (2002) también informaron que la vida útil de los filetes de bacalao en MAP (60:40 CO₂: N₂) almacenados a 2 °C se extendió de 11-12 a 21-26 días cuando se aplicó un tratamiento con AEO (0,05% (v / w)) sobre la superficie del filete. Además, Mahmoud *et al.* (2004) mostraron que la vida útil a 5 °C de los filetes de carpa sumergidos en un tratamiento con 1% de carvacrol: timol (1: 1) se extendió por 8 días (almacenado bajo condiciones de aire en bolsas de plástico). Kostaki *et al.* (2009) también informaron que la presencia de tomillo EO en combinación con MAP (60:30:10 CO₂: N₂: O₂) extendió la vida útil de los filetes de lubina de 6 a 17 días a 4 °C.

6.4. Conclusiones

Este estudio demostró que la vida útil de los filetes de pescado envasados en MAP y conservados a 4 °C puede extenderse 9 días más utilizando el nuevo sistema de envasado con inyección de vapor de AEO antes del MAP, de manera similar a un tratamiento con AEO convencional, consiguiendo 28 días de conservación. En ese sentido, la calidad microbiana de los filetes de dorada se asegura con el sistema de inyección de vapor de AEO antes del envasado MAP evitando la adición de agua en la superficie de los filetes y el riesgo de contaminación cruzada durante la descontaminación de productos alimentarios.

En ese sentido, los tratamientos con AEO redujeron el crecimiento microbiano, especialmente para *Enterobacteriaceae spp.* y *Pseudomonas sp.*

Las medidas de textura y color no son los parámetros más apropiados para establecer la vida útil de los filetes de pescado. Sin embargo, las muestras tratadas con el innovador tratamiento de vapor de AEO conservaron mejor la textura del filete en la primera semana de almacenamiento en comparación con la inmersión en nanoemulsión de AEO.

Los parámetros fisicoquímicos pH, TMA-N y la capacidad de retención de agua reflejaron bien la frescura de estas muestras tratadas.

Los análisis sensoriales mostraron una mejor valoración de los filetes tratado con AEO, no encontrándose sabores ni olores extraños procedentes del uso de AEO.

La aplicación industrial del tratamiento con vapor de AEO solo representaría un ligero incremento en la producción de costos del producto, lo que se justifica por la extensión de la vida útil de los filetes de pescado de 12-14 días a 28 días a 4 °C.

PARTE III

Resultados y discusión

Pescado entero



CAPÍTULO 7

Influencia de nuevos sistemas de envasado activo antimicrobiano sobre el incremento de la calidad y vida útil de dorada entera.

CAPÍTULO 7. INFLUENCIA DE NUEVOS SISTEMAS DE ENVASADO ACTIVO ANTIMICROBIANO EN EL INCREMENTO DE LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE DORADA ENTERA.

7.1. Introducción

En la zona Mediterránea, la dorada (*Sparus aurata*) es considerada como una de las especies de mayor valor económico y gastronómico, con una gran demanda para su consumo en fresco (APROMAR, 2019; Cakli *et al.*, 2007). En cambio, la vida útil de este pescado conservado en fresco es limitada ya que es un alimento bastante perecedero (Nagarajarao, 2016; Kriton *et al.*, 2018). El hielo aplicado como conservante es el método de almacenamiento más usado en pescado fresco debido a su eficiencia de enfriamiento y su alta disponibilidad (Tavakoli *et al.*, 2018). Esta técnica de conservación puede ser optimizada para prolongar la vida útil de los productos frescos mediante su combinación con agentes naturales, como son los aceites esenciales (AEs), debido principalmente a sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Además, los AEs son considerados como una buena alternativa a los conservantes químicos para la industria alimentaria (Hassoun and Emir-Çoban, 2017; López-Cánovas *et al.*, 2019).

Se ha probado que los AEs son muy efectivos ejerciendo su poder inhibitorio sobre el desarrollo de la flora alterante en alimentos conservados en fresco (López-Gómez *et al.*, 2019). Sin embargo, son muy volátiles y sensorialmente pueden aportar sabores y aromas extraños a los productos frescos (Burt, 2004). Como solución a la problemática derivada del uso de los AEs, la encapsulación en oligosacáridos cíclicos como β -ciclodextrinas (β -CD) formando un complejo de inclusión, ha sido un método ampliamente utilizado para disminuir estas características y efectos negativos (Buendía-Moreno *et al.*, 2019; Kamimura *et al.*, 2014; Kostaki *et al.*, 2009).

Varios estudios han comprobado que hielo de conservación incluyendo AEs reduce el crecimiento microbiano en el pescado fresco, lo que prolonga su vida útil y aumenta su seguridad. Tavakoli *et al.* (2018) estudiaron el efecto del aceite esencial de reshgak incluido en el hielo de conservación sobre la calidad de trucha arcoíris entera durante 20 días. Con este tipo de conservación consiguieron prolongar la vida útil de la trucha almacenada en hielo con AEs en 8 hasta días, con respecto a un control con hielo sin aditivo. Además, Bensid *et al.* (2014) obtuvieron una disminución en los valores del

nitrógeno básico volátil y ácido tiobarbitúrico de anchoa entera conservada de hielo con aceites esenciales (tomillo, orégano y clavo), y aumentaron su vida útil en 12 días con respecto a los 9 días en hielo normal. Sin embargo, la dosis de AEs utilizadas en estos estudios fue bastante elevada, lo que puede generar un fuerte olor sobre el hielo y posiblemente también transmitirlo al producto (Burt, 2004).

Si combinamos el hielo de conservación con la inclusión de AEs encapsulados en β -CD durante su fabricación, hablamos de hielo antimicrobiano. Este tipo de hielo alberga dosis bajas de AEs que se van liberando de forma gradual en contacto con el producto ejerciendo un efecto inhibitorio en el crecimiento microbiano y evitando así efectos negativos sobre las características organolépticas del alimento (López-Gómez *et al.*, 2018).

En este capítulo se ha evaluado el efecto del hielo antimicrobiano, incluyendo una combinación de AEs encapsulados en β -CD durante su fabricación, Carvacrol-Bergamota-Pomelo (3:1:1) a diferentes dosis, sobre la calidad y vida útil de doradas enteras frescas durante su período de conservación.

7.2. Plan experimental

Para llevar a cabo este ensayo de vida útil, se tomaron doradas (*Sparus aurata*) frescas procedentes de acuicultura (suministradas por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo, S.L.), con un peso medio de 550 ± 50 g por individuo y se clasificaron en base a los tratamientos aplicados (Figura 7.1).

El hielo que se utilizó en los diferentes tratamientos de conservación fue hielo picado normal (sin AEs+ β -CD) y hielo picado antimicrobiano (con AEs+ β -CD), aplicado en una proporción hielo: pescado de 1:3 (p/p). El hielo picado antimicrobiano utilizado fue de dos tipos: con una concentración de 50 y 100 mg de AEs \cdot kg⁻¹ de hielo).

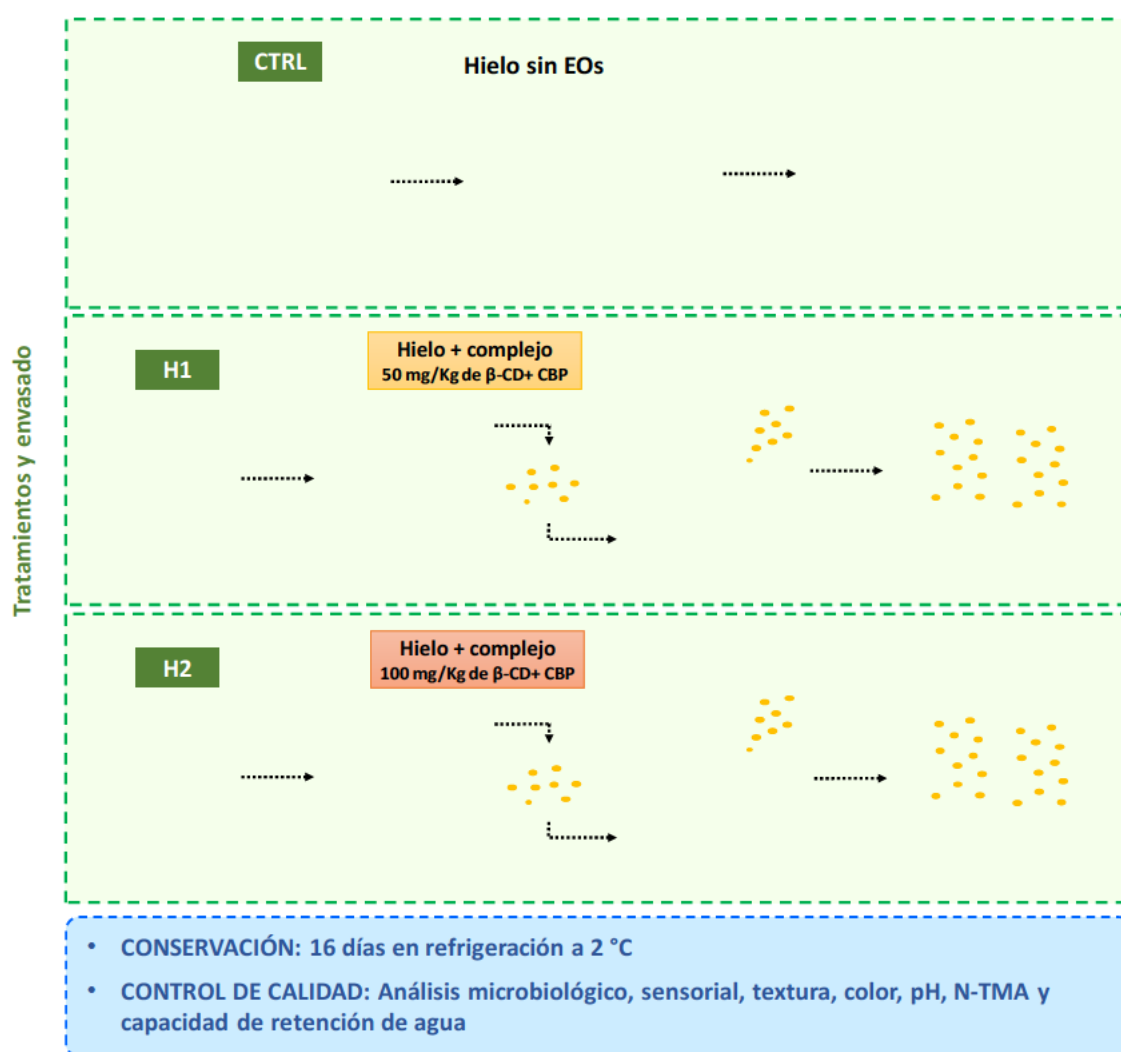


Figura 7.1. Esquema del plan experimental para el estudio de determinación de la vida útil de dorada entera fresca conservada en hielo y a 2 °C.

En este estudio se ha llevado a cabo la evaluación de las siguientes condiciones de envasado y conservación de dorada entera fresca:

- **CTRL**: doradas enteras frescas almacenadas en hielo picado sin aditivo.
- **H50**: doradas enteras frescas almacenadas en hielo picado con aditivo en dosis de 50 mg/kg de β -CD+ CBP.
- **H100**: doradas enteras frescas almacenadas en hielo picado con aditivo en dosis de 100 mg/kg de β -CD+ CBP.

Los análisis para la determinación de los parámetros de calidad se realizaron los días 1, 7, 13 y 16 de conservación en refrigeración a 2 °C.

Se realizaron análisis de microbiología y parámetros físico-químicos: pH, capacidad de retención de agua, nitrógeno de trimetilamina (N-TMA), color y textura; además de un análisis sensorial de las doradas enteras frescas y cocinadas en diferentes días de almacenamiento, cuyos resultados se detallan a continuación.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. *Análisis microbiológico*

Los recuentos microbiológicos obtenidos durante el estudio de conservación de dorada entera fresca en hielo se muestran en las Figuras 7.2-7.5. Todos los tratamientos obtuvieron valores iniciales muy bajos, siendo indicativo de buena calidad y buen manejo del pescado (Stamatis and Arkoudelos, 2007).

Los valores iniciales de enterobacterias (Figura 7.2) fueron muy bajos y se mantuvieron estables hasta el final del período de almacenamiento. Los tratamientos de hielo incluyendo AEs no presentaron diferencias significativas entre ellos, pero sí con respecto al factor tiempo. Al final del periodo de almacenamiento, día 16, los valores máximos para estos microorganismos fueron alcanzados por el tratamiento CTRL y las doradas almacenadas en hielo con β -CD+CBP (H50 y H100) presentaban una carga de enterobacterias menor (0,5 ciclos logarítmicos) con respecto al CTRL ($p<0,05$).

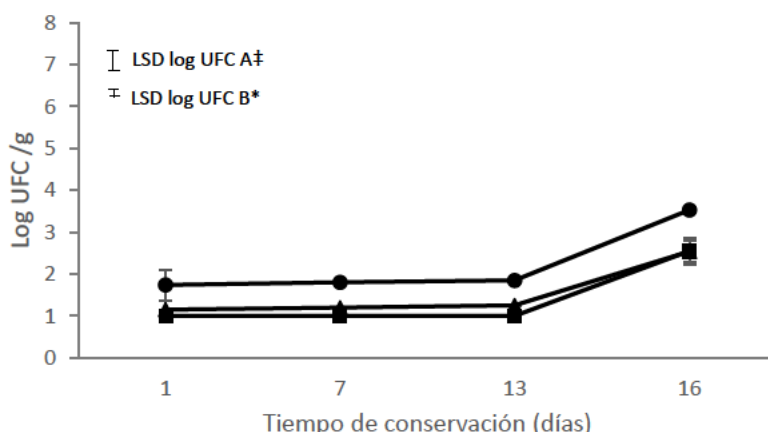


Figura 7.2. Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de *Enterobacteriaceae* spp. en doradas CTRL (hielo normal) (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (■) durante su periodo de almacenamiento a 2°C.

Las *Pseudomonas* son consideradas como bacterias indicadoras del deterioro en la calidad del pescado (Carrascosa *et al.*, 2015). Sus recuentos, al igual que ocurrió con *Enterobacteriaceae* spp., fueron inicialmente muy bajos y se mantuvieron estables hasta el día 13 de conservación, a partir del cual mostraron un incremento para todos los tratamientos estudiados. Al final del periodo de almacenamiento (16 días), el recuento de *Pseudomonas* fue mayor para las doradas almacenadas en hielo CTRL y H50, presentando diferencias significativas ($p < 0.001$) con respecto a las almacenadas con H100 obteniendo un recuento de medio ciclo logarítmico menor (Figura 7.3).

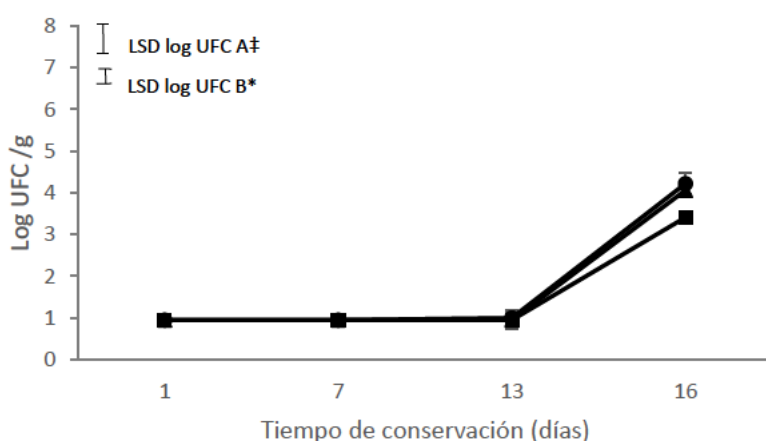


Figura 7.3. Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de *Pseudomonas* sp. en doradas almacenadas con hielo normal (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (■) durante 16 días de almacenamiento a 2°C.

Con respecto a la evolución de las bacterias ácido-lácticas (BAL), encontramos una ausencia de las mismas durante todo el periodo de almacenamiento (16 días) independientemente del tratamiento de envasado aplicado (datos no mostrados).

Los recuentos de microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) son considerados como determinantes en la calidad del pescado durante su conservación para poder estimar su vida útil (Carrascosa *et al.*, 2015; Mol *et al.*, 2007). La carga inicial de AMT no superó los 4 log UFC/g y su desarrollo durante el periodo de conservación presentó un incremento progresivo ($p < 0,05$). Un recuento de 7 log UFC/g está considerado como límite máximo de aceptación en pescado conservado en hielo para estos microorganismos (ICMSF, 1986; Ojagh *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta este límite, observamos que las doradas almacenadas en hielo picado normal (CTRL) presentaron una vida útil menor que las doradas almacenadas en hielo con β -CD+CBP. A los 16 días de almacenamiento se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, ya que este límite es superado por las doradas del CTRL mientras que las doradas del tratamiento H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) presentaban una reducción de la carga de AMT de casi un ciclo logarítmico y las doradas del H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) presentaban una disminución de 1,5 ciclos logarítmicos (Figura 7.4).

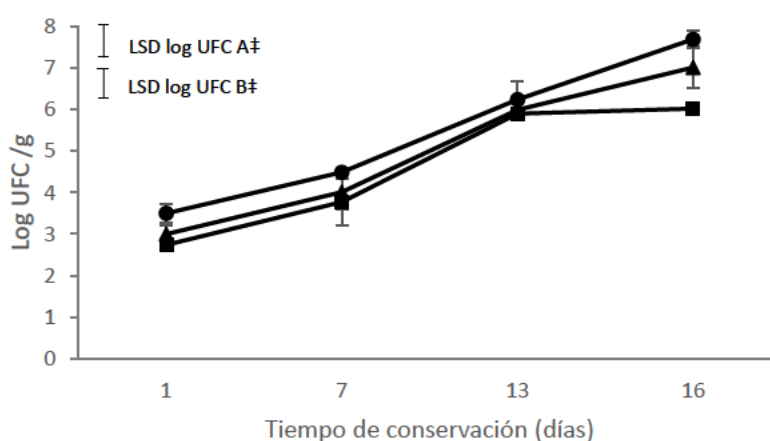


Figura 7.4. Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de aerobios mesófilos totales (AMT) en doradas almacenadas con hielo normal (●), hielo con 50 mg/kg de β -CD+CBP (▲) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (■) durante 16 días de almacenamiento a 2 °C.

Los resultados obtenidos en doradas almacenadas en hielo CTRL fueron similares a los obtenidos por Kilinc *et al.* (2007) y Cakli *et al.* (2007), que obtuvieron valores

microbiológicos superiores a los límites legales establecidos tras 15 días de almacenamiento de dorada en cajas con hielo a 4 °C, siendo estos valores del orden de 7-8,5 log UFC/g tanto para microorganismos aerobios mesófilos totales como para microorganismos psicrófilos según estos autores. Por el contrario, nuestros tratamientos con hielo β -CD+CBP (H50 y H100) presentaron valores inferiores para microorganismos mesófilos totales.

Al igual que ocurrió con los AMT, la población de los microorganismos psicrófilos fue mayor que la de otros microorganismos estudiados y sus recuentos también son determinantes en la vida útil del pescado refrigerado siendo los principales responsables del deterioro aeróbico del mismo (Ahmad *et al.*, 2012; Ojagh *et al.*, 2010).

La evolución de los microorganismos psicrófilos presenta diferencias significativas con respecto al factor tiempo ($p < 0,01$) para todos los tratamientos debido a su desarrollo progresivo durante todo el período de conservación. El recuento de estos microorganismos fue superior en las doradas conservadas en hielo control que las doradas conservadas con los tratamientos H50 y H100, durante todo el periodo de conservación. No se encontraron diferencias significativas entre las doradas conservadas con los tratamientos H50 y H100 (Figura 7.5). Tavakoli *et al.* (2018) obtuvieron valores similares en truchas conservadas en hielo con AE Reshgak (1500 mg / kg) donde el recuento de estos microorganismos era menor.

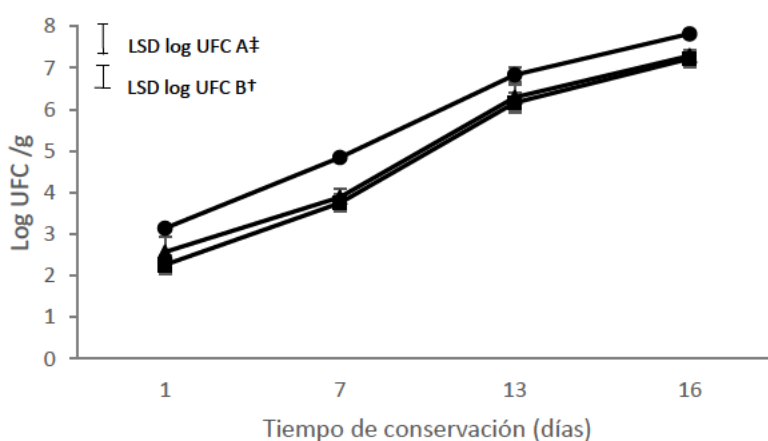


Figura 7.5. Evolución de los recuentos (Log UFC/g) de microorganismos aerobios psicrófilos en doradas almacenadas con hielo normal (●), hielo con 50 mg/kg de β -CD+CBP (▲) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (■) durante 16 días de almacenamiento a 2 °C.

7.3.2. Análisis físico-químicos

- **Determinación de pH**

Los valores encontrados fueron aumentando durante el periodo de almacenamiento para todas las condiciones estudiadas (Tabla 7.1). Este aumento de pH es debido a la acumulación de compuesto alcalinos como amoníaco y N-TMA, así como aminas biógenas producidas por el deterioro bacteriano (Goulas and Kontominas, 2007). Así, Abbas *et al.* (2008) encontraron una correlación negativa entre la frescura del pescado y el pH. Así, conforme aumenta el valor de pH disminuye la frescura del pescado. Pero, Ruíz–Capillas y Moral (2001) proponen que, a pesar de encontrar un aumento significativo del pH durante el deterioro del pescado, se utilice este parámetro más como una guía de calidad que como un índice propiamente dicho ya que el pH inicial del pescado una vez sacrificado es muy variable dependiendo de otros parámetros como el estado nutricional del pescado y del tipo de captura empleada.

No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo día de muestreo, pero sí existen diferencias significativas para los valores de pH del mismo tratamiento durante el periodo de almacenamiento.

Tabla 7.1. Valores de pH para doradas enteras envasadas en hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100) durante su almacenamiento a 2°C ($n=3 \pm SD$).

Tratamiento	Tiempo de conservación (Días)			
	1	7	13	16
CTRL	6,36 \pm 0,02 ^a	6,33 \pm 0,06 ^b	6,35 \pm 0,05 ^b	6,42 \pm 0,05 ^a
H1	6,38 \pm 0,06 ^b	6,38 \pm 0,03 ^b	6,24 \pm 0,02 ^c	6,49 \pm 0,05 ^a
H2	6,33 \pm 0,04 ^b	6,31 \pm 0,04 ^b	6,33 \pm 0,05 ^b	6,47 \pm 0,02 ^a

Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento

En el día 13 de conservación, los valores obtenidos mostraron diferencias significativas de pH con respecto a los demás días de muestreo, observándose valores más bajos en los tratamientos con hielo que incluye aditivo (H50 y H100). El valor de pH es importante tanto para la textura como para otros parámetros de calidad como la CRA, el crecimiento bacteriano y el color (Foegeding *et al.*, 1996).

A los 16 días de almacenamiento obtenemos valores similares a los encontrados por Cakli *et al.* (2007) para doradas almacenadas en hielo a 4 °C, con valores en torno a 6,5. Los valores obtenidos al final del periodo de almacenamiento están por debajo de los valores de 6,8-7, establecidos como el máximo nivel aceptable de pH en pescado (Erkan y Üretener, 2010).

- **Capacidad de retención de agua (CRA)**

Durante el periodo de almacenamiento observamos una pérdida en la CRA para las tres condiciones estudiadas, siendo en el día 13 de conservación cuando se obtuvieron las cifras más bajas, con valores de 75 % para los tratamientos CTRL y H50 y 77 % en el tratamiento H100. No se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo día de muestreo, pero sí existen diferencias significativas para los valores de CRA del mismo tratamiento a lo largo de todo el periodo de almacenamiento.

Con los cambios autolíticos se produce la hidrólisis del glucógeno y las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas sufren alteraciones, lo que da lugar a una disminución de la capacidad de ligar agua del músculo y tiene consecuencias sobre la textura y la apariencia (Olsson *et al.*, 2003). Álvarez *et al.* (2012) afirman que un incremento de la pérdida de agua está relacionado con el deterioro del pescado. Es decir, un valor bajo del porcentaje en CRA es indicativo de una pérdida de calidad del pescado. Según Campus *et al.* (2010), la capacidad de retener agua es de un 70-80 % para pescado fresco. Al final del periodo de almacenamiento a 2 °C, los valores de CRA en doradas se mantuvieron en el rango considerado para pescado fresco para todas las condiciones estudiadas (Tabla 7.2.).

Tabla 7.2. Evolución de la CRA para doradas enteras envasadas en hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100) durante su almacenamiento a 2°C ($n=3 \pm SD$).

Tratamiento	Tiempo de conservación (Días)			
	1	7	13	16
CTRL	84,07 \pm 3,93 ^a	78,76 \pm 1,85 ^{bc}	75,60 \pm 1,58 ^c	80,02 \pm 4,06 ^b
H1	81,66 \pm 3,16 ^a	79,78 \pm 0,27 ^a	75,98 \pm 2,93 ^b	79,76 \pm 1,71 ^a
H2	82,39 \pm 0,84 ^a	77,62 \pm 2,87 ^b	77,64 \pm 0,15 ^b	79,08 \pm 1,31 ^{ab}

Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento

• *Análisis de Color*

En la Tabla 7.3 se muestran los distintos valores encontrados en los parámetros de color a lo largo del periodo de conservación. Así, para el parámetro L^* , no encontramos diferencias significativas entre los tres tipos de almacenamiento. El parámetro a^* varió según el día de tratamiento y el tipo de almacenamiento. Así, en el día 1 de almacenamiento no existen diferencias significativas entre los tratamientos. En cambio, en el día 7 observamos diferencias significativas entre las doradas almacenadas en hielo CTRL y las doradas almacenadas con hielo con β -CD+CBP (H50 y H100). En el día 13, observamos diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las doradas almacenadas con hielo picado con 50 mg/kg β -CD+CBP (H50) y las doradas almacenadas con hielo picado con 100 mg/kg β -CD+CBP (H100). Al final del periodo de almacenamiento (día 16) no se observaron diferencias significativas entre las distintas doradas almacenadas.

Tabla 7.3. Evolución de los parámetros de color en doradas enteras envasadas en hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100) durante su almacenamiento a 2 °C ($n=3 \pm SD$).

Tiempo (Días)	Tratamiento	L^*	a^*	b^*
1	CTRL	71,63 \pm 4,86	-0,56 \pm 0,27	1,17 \pm 0,28
	H50	75,47 \pm 4,47	-0,60 \pm 0,20	0,77 \pm 0,10
	H100	77,05 \pm 0,85	-0,79 \pm 0,03	0,66 \pm 0,15
7	CTRL	73,83 \pm 1,60	-0,75 \pm 0,11	2,10 \pm 0,20
	H50	81,61 \pm 4,58	-0,30 \pm 0,13	1,17 \pm 0,48
	H100	77,77 \pm 3,73	-0,10 \pm 0,02	0,37 \pm 0,14
13	CTRL	79,09 \pm 2,49	-0,51 \pm 0,18	0,52 \pm 0,06
	H50	76,62 \pm 1,31	-0,80 \pm 0,04	0,69 \pm 0,35
	H100	86,75 \pm 1,84	-0,42 \pm 0,14	1,83 \pm 0,17
16	CTRL	74,44 \pm 0,88	-0,67 \pm 0,08	0,56 \pm 0,21
	H50	74,23 \pm 3,25	-0,59 \pm 0,08	1,14 \pm 0,17
	H100	78,12 \pm 2,92	-0,64 \pm 0,14	1,43 \pm 0,33
Días (A)		(4,05) \dagger	(0,18) \dagger	ns
Tratamiento (B)		(3,50) \dagger	ns	ns
(A x B)		(5,17)*	(0,42) \ddagger	(0,76) \ddagger

ns: no significancia ($p > 0,05$); *, \dagger , \ddagger significancia para $P \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente.

El parámetro b^* presentó diferencias significativas entre la interacción de las doradas almacenadas con hielo CTRL y hielo picado con 100 mg/kg β -CD+CBP (H100) durante todo el periodo de almacenamiento.

- ***Análisis de perfil de textura (TPA)***

Los resultados obtenidos en el análisis de perfil de textura se muestran en la Tabla 7.4. Los valores de dureza fueron disminuyendo con el tiempo. Suárez *et al.* (2005) demostraron que existe una disminución de la dureza en el pescado durante su almacenamiento en frío. Al inicio del periodo de almacenamiento la dureza fue menor en las doradas almacenadas con hielo picado con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100), existiendo diferencias significativas entre este grupo y los otros dos grupos (CTRL y H50). Estas diferencias no se mantienen durante el resto de los días de almacenamiento donde no se observan diferencias significativas en el parámetro dureza. Esta diferencia al inicio del periodo de almacenamiento podría estar ocasionada por los cambios bioquímicos que se producen tras la captura y el *rigor mortis*. Cuanto mayor es la dureza mayor es la dificultad de masticar. De hecho, la dureza es la característica de textura más importante para los consumidores y es la característica determinante para la valoración comercial (Jain *et al.*, 2007).

Para el parámetro gomosidad, encontramos diferencias significativas entre las doradas almacenadas con hielo normal (CTRL) y las doradas almacenadas con hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50), con respecto a las doradas almacenadas con hielo picado con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100), que presentan un valor menor. Durante el periodo de almacenamiento observamos una disminución de la gomosidad para todas las condiciones evaluadas. Al final del periodo de almacenamiento observamos diferencias significativas entre las doradas almacenadas con hielo picado (CTRL) y las doradas almacenadas con hielo picado con β -CD+CBP (H50 y H100), siendo el valor de la gomosidad mayor que el encontrado para las doradas control.

Los parámetros de cohesividad y elasticidad se mantuvieron más o menos constantes durante todo el almacenamiento, observándose una ligera disminución de los valores de estos parámetros, pero sin observarse diferencias significativas entre las tres condiciones estudiadas.

El parámetro adhesividad se mantuvo más o menos constante, aunque en el día 7 observamos diferencias significativas entre las doradas almacenadas con hielo picado

(CTRL) y las doradas almacenadas con hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50). Estas diferencias no se mantuvieron durante los días 13 y 16.

El parámetro masticabilidad disminuyó durante el almacenamiento a 2 °C, observándose a los 16 días de almacenamiento diferencias significativas entre las doradas almacenadas con hielo picado (CTRL) y las doradas almacenadas con hielo picado con β -CD+CBP (H50 y H100).

Tabla 7.4. Evolución de la textura para dorada entera envasada con hielo picado normal (CTRL), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100) durante su almacenamiento a 2 °C (n=3 \pm SD).

Tiempo (Días)	Tratamiento	Dureza	Cohesividad	Adhesividad	Elasticidad	Gomosidad	Masticabilidad
1	CTRL	14,48 \pm 2,79	0,25 \pm 0,06	-0,72 \pm 0,05	0,34 \pm 0,04	4,13 \pm 1,39	1,41 \pm 0,63
	H50	15,54 \pm 2,46	0,26 \pm 0,02	-0,67 \pm 0,11	0,37 \pm 0,05	3,70 \pm 0,63	1,37 \pm 0,13
	H100	10,45 \pm 1,53	0,21 \pm 0,04	-0,64 \pm 0,04	0,36 \pm 0,03	1,94 \pm 0,19	0,68 \pm 0,05
7	CTRL	9,09 \pm 1,28	0,20 \pm 0,04	-0,81 \pm 0,11	0,32 \pm 0,02	1,66 \pm 0,50	0,65 \pm 0,16
	H50	7,27 \pm 1,21	0,22 \pm 0,01	-0,59 \pm 0,07	0,36 \pm 0,05	1,48 \pm 0,14	0,50 \pm 0,06
	H100	6,84 \pm 1,16	0,19 \pm 0,03	-0,74 \pm 0,05	0,31 \pm 0,03	1,12 \pm 0,38	0,35 \pm 0,14
13	CTRL	7,48 \pm 0,97	0,19 \pm 0,04	-0,70 \pm 0,14	0,36 \pm 0,03	1,49 \pm 0,16	0,55 \pm 0,08
	H50	6,56 \pm 1,08	0,18 \pm 0,01	-0,57 \pm 0,17	0,42 \pm 0,13	0,96 \pm 0,02	0,48 \pm 0,08
	H100	6,45 \pm 1,32	0,23 \pm 0,04	-0,64 \pm 0,02	0,40 \pm 0,14	1,15 \pm 0,30	0,45 \pm 0,09
16	CTRL	7,19 \pm 1,40	0,15 \pm 0,07	-0,80 \pm 0,07	0,26 \pm 0,03	0,59 \pm 0,10	0,15 \pm 0,04
	H50	6,84 \pm 1,09	0,17 \pm 0,03	-0,69 \pm 0,08	0,29 \pm 0,02	1,25 \pm 0,09	0,36 \pm 0,05
	H100	6,22 \pm 0,91	0,18 \pm 0,02	-0,76 \pm 0,15	0,29 \pm 0,02	1,12 \pm 0,15	0,34 \pm 0,04
Días (A)		(2,29)‡	(0,04)‡	(0,07)*	(0,06)†	(0,87)‡	(0,36)‡
Tratamiento (B)		(1,09)*	ns	(0,11)‡	(0,04)*	(0,56)†	(0,17)*
(A x B)		ns	(0,05)†	ns	ns	(1,13)†	(0,34)*

ns: no significancia ($p>0,05$); *, †, ‡ significancia para $P \leq 0,05$, 0,01 y 0,001, respectivamente.

• *Determinación de N-TMA*

Observamos que los valores obtenidos en el primer día de almacenamiento son muy bajos lo que es indicativo de frescura (Figura 7.6). Durante el periodo de almacenamiento existe un aumento progresivo de los valores de N-TMA para todas las condiciones estudiadas observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) para el mismo tratamiento en los diferentes días de muestreo. Para cada día de muestreo existen diferencias significativas entre todos los tratamientos CTRL, H50 y H100. En el día 16 observamos diferencias significativas entre las doradas almacenadas con hielo CTRL y las doradas almacenadas con hielo con β -CD+CBP (H50 y H100), encontrando valores de N-TMA menores en estos últimos tratamientos que en las doradas CTRL. Los valores obtenidos están muy por debajo de los valores establecidos por diferentes autores como límite de aceptabilidad, que según Dalgaard *et al.* (1993) se establece en 10-15 mg/100 g, mientras que autores como Sikorski *et al.* (1989) lo establecen en 5-10 mg/100 g. Además, los valores obtenidos al final del periodo de almacenamiento son similares a los obtenidos por Kyrana and Lougovois (2002), Papadopoulos *et al.* (2003) y Tejada y Huidobro (2002) en lubina y dorada almacenadas en hielo.

Según la FAO (1986) los valores de TMA en pescado fresco están en torno a 1 mg/100 g, mientras que en pescado deteriorado está sobre los 8 mg/100 g.

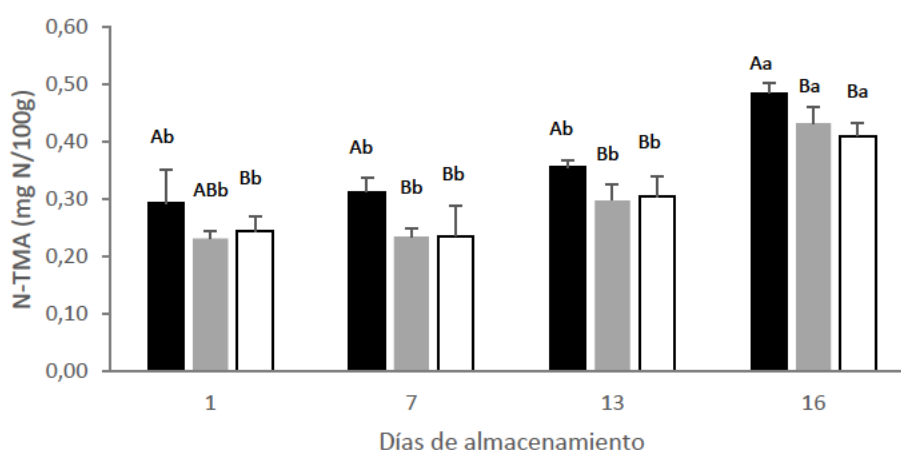


Figura 7.6. Evolución del N-TMA (mg/100g) en filetes de dorada envasadas en hielo picado normal (CTRL) (barra negra), hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50) (barra gris) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100) (barra blanca) durante su periodo de almacenamiento a 2°C ($n=3 \pm SD$). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

7.3.3. Evaluación sensorial

El análisis sensorial se muestra en las Figuras 7.7 y 7.8. En la Figura 7.9 se observa el aspecto general de las doradas conservadas con los diferentes tipos de hielo en los días 7, 13 y 16 de análisis. Aunque la puntuación para las doradas en el análisis sensorial al inicio del periodo de almacenamiento fue similar, tras 7 días de almacenamiento se comenzaron a ver diferencias entre ellas. Así, las doradas enteras almacenadas en hielo picado (CTRL) a 2 °C presentaron un aspecto aceptable para el consumidor hasta el día 13. En cambio, las doradas almacenadas con hielo picado con 50 mg/kg de β -CD+CBP (H50) y hielo con 100 mg/kg de β -CD+CBP (H100) presentaron un aspecto aceptable para el consumidor hasta el día 16, si bien es cierto que las características típicas de pescado fresco se ven disminuidas. La adición de AEs encapsulados en las β -CD no afectó al olor de las doradas frescas.

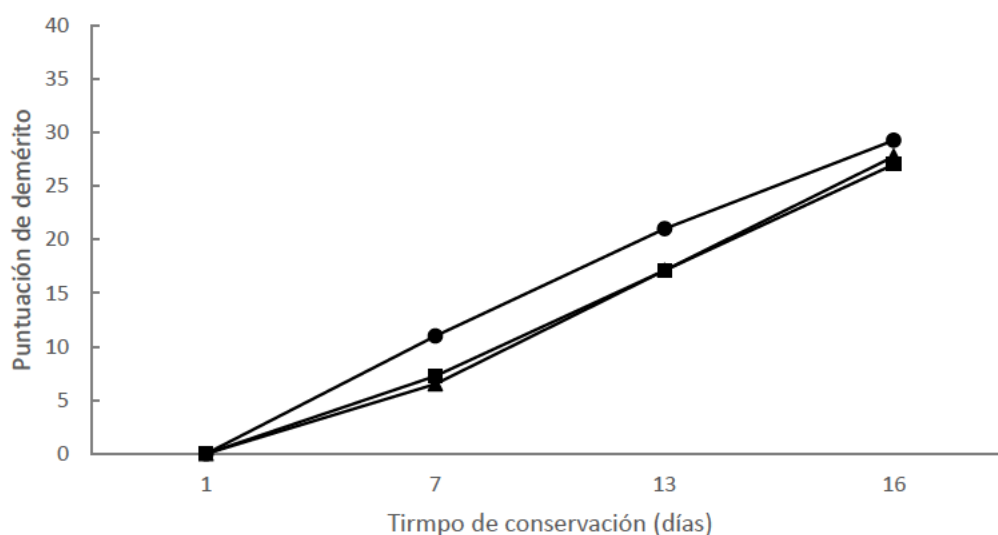


Figura 7.7. QIM, puntuación de doradas frescas envasadas con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (■) durante su almacenamiento a 2°C.

En las doradas cocinadas no se apreció sabor ni olor a aceites esenciales en ninguna de las doradas almacenadas en hielo con β -CD+CBP, para ninguno de los días evaluados. Observamos una mejor apreciación por parte de los panelistas de las doradas almacenadas en hielo picado con β -CD+CBP durante todo el almacenamiento, ya que los filetes conservados con hielo H50 y H100 tenían más jugosidad que los del CTRL que se encontraban más secos.

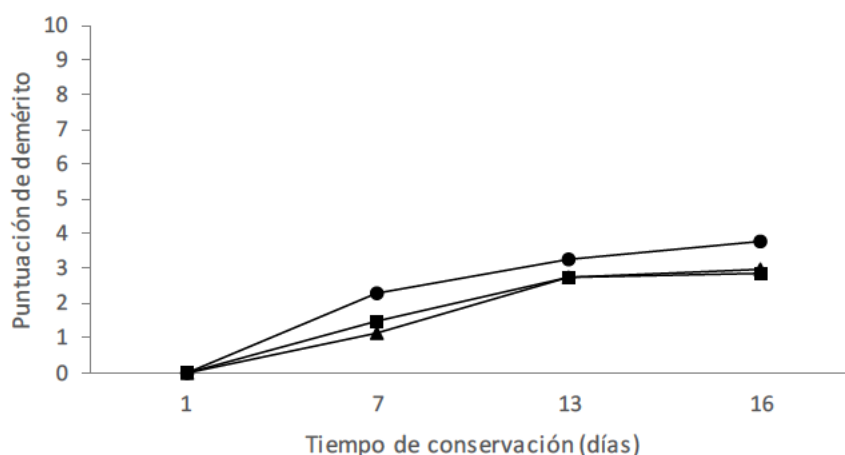


Figura 7.8. QIM, puntuación de doradas cocinadas envasadas con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (■) durante su período de almacenamiento a 2 °C.

La apariencia es un parámetro importante para evaluar la calidad sensorial de un producto (Dos Santos *et al.*, 2015). En la Figura 7.9 se observa el aspecto general que mostraban las doradas conservadas con los distintos tratamientos en los días 7, 13 y 16. En el día 7 no se aprecian grandes diferencias entre tratamientos. Es en los últimos días de conservación en los que podemos observar una mayor pérdida de luminosidad y opacidad ocular para las muestras CTRL, con respecto a las de los tratamientos con hielo antimicrobiano (H50 y H100)



Figura 7.9. Detalle de la apariencia general de las doradas almacenadas en hielo CTRL, H50 y H100 en los días 7, 13 y 16 de análisis a 2 °C.

7.4. Conclusiones

Las doradas almacenadas con hielo encapsulado con β -CD+CBP presentaron una carga microbiológica menor durante el periodo de almacenamiento, llegando a reducir 1,5 log UFC/g para los microorganismos aerobios mesófilos y 1 ciclo logarítmico para los microorganismos psicrófilos, que son los microorganismos de los más abundantes y los que vienen limitados a nivel legislativo, por ser un producto conservado en refrigeración.

La conservación de las doradas con hielo encapsulado con β -CD+CBP alargan la vida útil hasta 5 días con respecto a los métodos tradicionales de conservación del pescado entero fresco (CTRL) que se limita a los 13 días. Este aumento de vida útil se debe principalmente al control del crecimiento de la flora alterante del pescado durante el almacenamiento del mismo y a la ralentización del proceso de deterioro del pescado que se pone de manifiesto, sobretodo, por el análisis sensorial y por los valores de N-TMA, que es un parámetro indicativo del deterioro.

De esta manera, podemos concluir que esta tecnología de conservación con AEs nanoencapsulados e incluidos en el hielo como antimicrobianos naturales es interesante y aconsejable para la industria pesquera, ya que aumenta la vida útil del producto y mantiene su calidad. Según los resultados obtenidos no existen grandes diferencias de efectividad y mejora entre los envasados con hielo H50 y H100, por lo que, desde el punto de vista económico, es más viable el tratamiento de envasado con H50.

CAPÍTULO 8

**Estudio de calidad y vida útil
de dorada entera aturdida y
conservada con hielo
incluyendo aceites esenciales
nanoencapsulados.**

CAPÍTULO 8. ESTUDIO DE CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE DORADA ENTERA ATURDIDA Y CONSERVADA CON HIELO INCLUYENDO ACEITES ESENCIALES NANOENCAPSULADOS.

8.1. Introducción

La dorada (*Sparus aurata*) es una de las principales especies cultivadas en numerosos países mediterráneos, debido a sus apreciadas características organolépticas (APROMAR, 2019). Sin embargo, la dorada fresca es altamente susceptible al deterioro durante el almacenamiento de hielo (Carrascosa *et al.*, 2015; Kriton *et al.*, 2018).

La conservación en hielo es un método ampliamente utilizado en el sector pesquero pero este método podría ser mejorado (Tavakoli *et al.*, 2018). Esta es la razón por la cual se han reportado métodos de formación de hielo utilizando diversos antimicrobianos y antioxidantes, como son los aceites esenciales (AEs), ya que son una alternativa a los conservantes químicos utilizados en los alimentos y tienen un efecto positivo sobre el pescado mejorando su calidad (Ozyurt *et al.*, 2012; Hassoun and Çoban, 2017; Gokoglu, 2018; Tavakoli *et al.*, 2018).

Los AEs pueden afectar negativamente las propiedades sensoriales del pescado durante su conservación debido a su fuerte aroma (Hassoun and Çoban, 2017). Para evitar estos efectos sensoriales indeseables y reducir, a su vez las pérdidas de AEs por su alta volatilidad, las ciclodextrinas (CD) podrían usarse para encapsular los AEs mediante la formación de un complejo de inclusión (Fenyvesi *et al.*, 2016).

La caracterización del complejo de inclusión se ha estudiado generalmente solo para un tipo de EO (Kamikura *et al.*, 2014; Menezes *et al.*, 2016; Piletti *et al.*, 2017), y no para una combinación de diferentes AEs como se utiliza en este ensayo. La combinación de AEs utilizada, “CBP”, está compuesta por Carvacrol (compuesto mayoritario del AE de orégano y muy estudiado como antimicrobiano y antioxidante en pescado (Rodríguez-García *et al.*, 2016), Bergamota y Pomelo.

Por otro lado, el sacrificio de las doradas es un tema de bastante interés porque se ha probado que el pez sufre durante su muerte. De esta manera, se han realizado estudios en los que se ha manifestado que un aturdimiento de los peces previo al sacrificio disminuye los niveles de estrés y sufrimiento como se describe López-Cánovas *et al.* (2019).

En este estudio se ha llevado a cabo también un aturrido previo al sacrificio de los peces aplicando aceite esencial de Clavo (CEO) encapsulado en ciclodextrinas e incluidos en el hielo para el sacrificio por hipotermia de las doradas. Con la variable del aturrido añadida a este estudio se observará el efecto sobre la calidad durante su conservación.

8.2. Plan experimental

Para la determinación de la vida útil, se tomaron doradas (*Sparus aurata*) frescas procedentes de acuicultura (suministradas por la empresa Servicios Atuneros del Mediterráneo, S.L.), que tenían un peso medio de unos 650 ± 50 g cada una.

El hielo que se utilizó en los diferentes tratamientos de aturrido fue hielo picado normal (sin AEs+ β -CD) y hielo picado incluyendo el complejo de inclusión CEO+ β -CD a las concentraciones de 10 y 15 mg de CEO \cdot kg⁻¹ de hielo. El aturrido / sacrificio de las doradas se realizó como se describe en López-Cánovas *et al.* (2019), por hipotermia con hielo picado en suspensión (con una proporción de 1: 1: 1 en peso, agua de mar: hielo: pescado). Transcurridas 2 horas desde el sacrificio, las piezas de dorada se colocaron en cajas de poliestireno y se cubrieron con hielo picado para su conservación (en una proporción hielo: pescado de 1: 3, p / p). El hielo picado de conservación utilizado fue de dos tipos: hielo normal (control) y hielo antimicrobiano (incluyendo CBP+ β -CD en una concentración de 50 mg de AEs \cdot kg⁻¹ de hielo). Los diferentes tratamientos estudiados en este trabajo son los siguientes:

- **CTRL-HC**: Sacrificio tradicional y conservación de dorada entera en hielo picado normal.
- **CTRL-HA**: Sacrificio tradicional con hielo picado normal y conservación de dorada entera en hielo picado con 50 mg CBP+ β -CD \cdot kg⁻¹.
- **T10-HC**: Aturrido / sacrificio con hielo a la concentración de 10 mg CEO+ β -CD \cdot kg⁻¹ y conservación de dorada entera en con hielo picado normal.
- **T10-HA**: Aturrido / sacrificio con hielo a la concentración de 10 mg CEO+ β -CD \cdot kg⁻¹ y conservación de dorada entera en hielo picado con 50 mg CBP+ β -CD \cdot kg⁻¹.
- **T15-HC**: Aturrido / sacrificio con hielo a la concentración de 15 mg CEO+ β -CD \cdot kg⁻¹ y conservación de dorada entera con hielo picado normal.

- **T15-HA**: Aturdido / sacrificio con hielo a la concentración de 15 mg CEO+ β -CD \cdot kg⁻¹ y conservación de dorada entera en hielo picado con 50 mg CBP+ β -CD \cdot kg⁻¹.

Las cajas de poliestireno fueron provistas de agujeros para el drenaje del agua, y fueron transportadas a la planta piloto de la Universidad Politécnica de Cartagena para ser almacenadas en una cámara refrigerada a 2 °C durante 17 días. El hielo derretido se reemplazaba diariamente por hielo nuevo. Para realizar los diferentes análisis se tomaron 4 doradas los días de muestreo: 1, 7, 11, 15 y 17 de conservación.

8.3. Resultados y discusión

8.3.1. Caracterización del complejo de inclusión.

Para la caracterización del complejo de inclusión aplicado en el hielo de conservación se utilizaron los siguientes métodos.

- **Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)**

La Figura 8.1 muestra los termogramas obtenidos por DSC para el carvacrol y los complejos de inclusión de β -CD-carvacrol. La curva DSC de carvacrol muestra un pico endotérmico agudo a 241,17 °C, correspondiente a su punto de ebullición, mientras que la curva DSC del complejo β -CD-carvacrol no mostró dicho pico, lo que indica que se ha realizado la encapsulación molecular del carvacrol en el interior de la cavidad de la β -CD. Otros autores (Kamikura *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015; Piletti *et al.*, 2017) encontraron resultados similares.

Las curvas obtenidas por DSC de la combinación de carvacrol, bergamota y pomelo AEs (3: 1: 1) y del complejo de inclusión carvacrol:bergamota:pomelo+ β -CD (CBP+ β -CD), se presentan en la Figura 8.2. La curva DSC de la mezcla de carvacrol, bergamota y pomelo muestra un pico endotérmico amplio a 233,62 °C, correspondiente a los diferentes puntos de ebullición de la mezcla de aceites esenciales. Al igual que en el complejo de β -CD+carvacrol, en la curva del complejo CBP+ β -CD no se mostró el pico de la mezcla de aceites esenciales. Por lo tanto, el análisis mediante DSC confirma la formación de complejos de inclusión debido a que la eliminación de los picos es una prueba indirecta de que se ha formado un complejo de inclusión (Kamikura *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015).

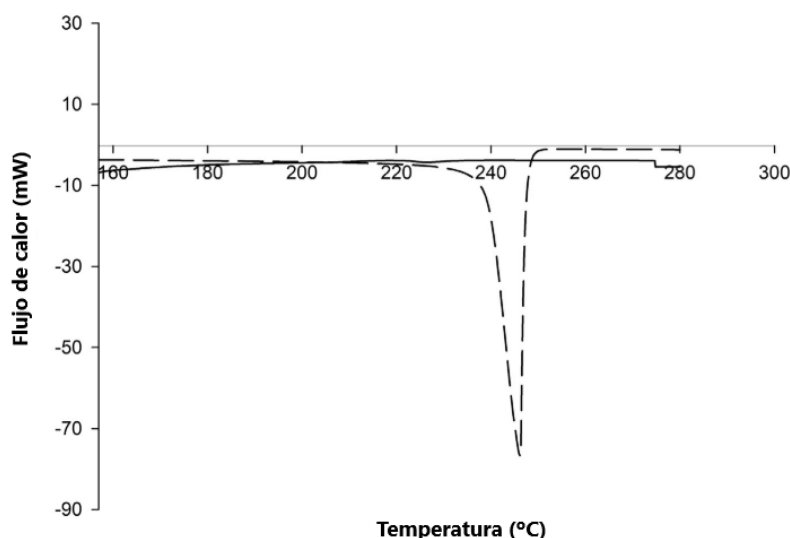


Figura 8.1. Termogramas obtenidos en calorimetría diferencial de barrido (DSC) de carvacrol (línea discontinua) y del complejo de inclusión β -CD-carvacrol (línea continua).

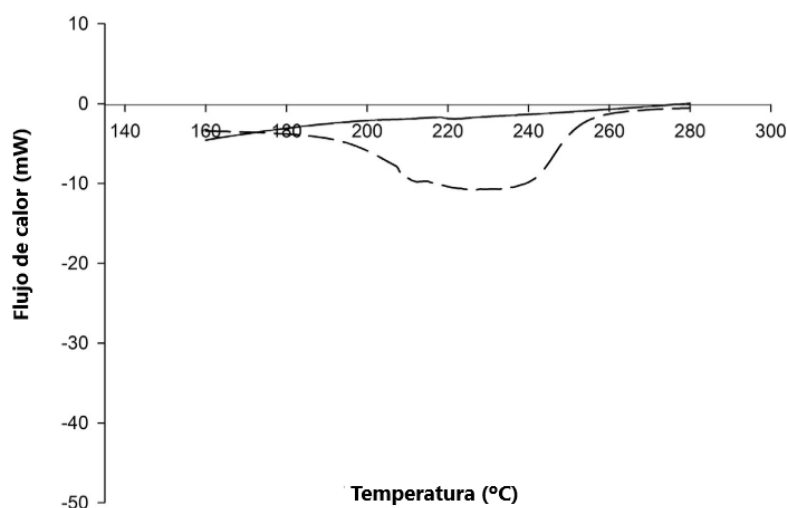


Figura 8.2. Termogramas obtenidos en calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la combinación de AEs carvacrol, bergamota y pomelo (3:1:1) (línea discontinua) y del complejo de inclusión CBP+ β -CD (línea continua).

Los termogramas para la estructura de las β -CD fueron relativamente estables en un rango de temperaturas de 100 °C y 250 °C como se muestra en las Figuras 8.2. y 8.3. Piletti *et al.* (2017) encontraron resultados similares.

- **Eficiencia de atrapamiento (EA)**

La EA se utiliza para determinar la cantidad de AEs atrapados en el complejo de inclusión. El porcentaje de atrapamiento de AEs en la cavidad de las β -CD fue del

68,16%. Otros autores encontraron resultados similares. Menezes *et al.* (2016) encontraron valores del 71,68% en el complejo de inclusión de β -CD+carvacrol preparado con el método de atrapamiento en suspensión y del 34,30% en el complejo de inclusión de β -CD+carvacrol preparado con el método de atrapamiento en pasta. Kamikura *et al.* (2014) reportaron que los métodos de amasado y liofilizado utilizados para obtener complejos de inclusión atraparon carvacrol de manera muy efectiva. Encontraron valores de EA del 78.09 y 83.74% para ambos métodos de formación de complejos de inclusión. Por lo tanto, el método de amasado atrapó la mezcla de CBP de manera efectiva.

- ***Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR)***

La formación del complejo de inclusión CBP+ β -CD se evaluó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). La figura 8.3 muestra el espectro FTIR obtenido por la mezcla de AEs CBP, las β -CD y el complejo de inclusión CBP+ β -CD en el rango de longitud de onda de 3600 a 2400 cm^{-1} .

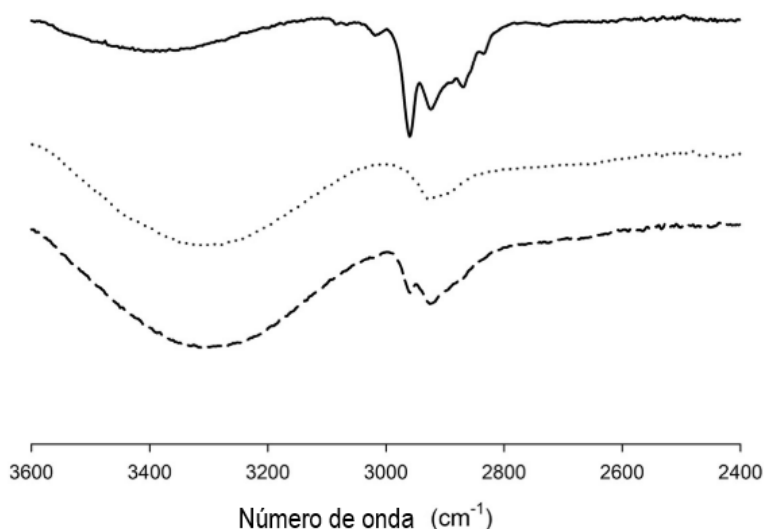


Figura 8.3. Espectro FTIR obtenido por la mezcla CBP (línea continua), β -CD (línea punteada) y el complejo de inclusión CBP+ β -CD (línea discontinua) en el rango espectral de 3600 a 2400 cm^{-1} .

La técnica FTIR se utiliza para confirmar la presencia de elementos químicos específicos en los complejos de inclusión (Piletti *et al.*, 2017). El espectro obtenido para el complejo de inclusión CBP+ β -CD muestra la representación típica de una interacción física entre la mezcla de AEs CBP y las moléculas de β -CD (Figura. 8.4.). Piletti *et al.* (2017) encontraron resultados similares en el espectro FITR obtenido para eugenol, moléculas

de β -CD y el complejo de inclusión β -CD+eugenol. El espectro FTIR obtenido para el complejo CBP+ β -CD muestra las características de la banda de absorción de la mezcla de CBP y las moléculas de β -CD.

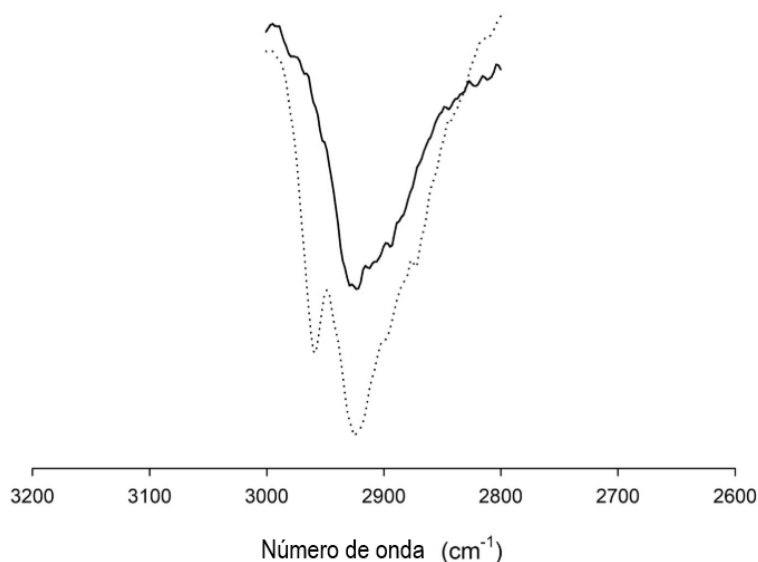


Figura 8.4. Espectro FTIR obtenido por β -CD (línea continua) y el complejo de inclusión CBP+ β -CD (línea punteada) en el rango espectral de 3600 a 2400 cm^{-1} .

▪ *Microscopía electrónica de barrido (SEM)*

Para evaluar la estructura morfológica y la forma de los complejos de inclusión, se realizó análisis de imagen mediante SEM. Las imágenes obtenidas por SEM se muestran en la Figura 8.5. La Figura 8.5. (A) muestra imágenes obtenidas para CBP+ β -CD con 200x. La morfología de la superficie de las β -CD aparece como una estructura de bloques cristalinos irregulares con superficie dura y cristales grandes. Choi *et al.* (2009), Prabu *et al.* (2015) y Piletti *et al.* (2017), reportaron que la presencia de cristales grandes indica que se formaron complejos de inclusión.

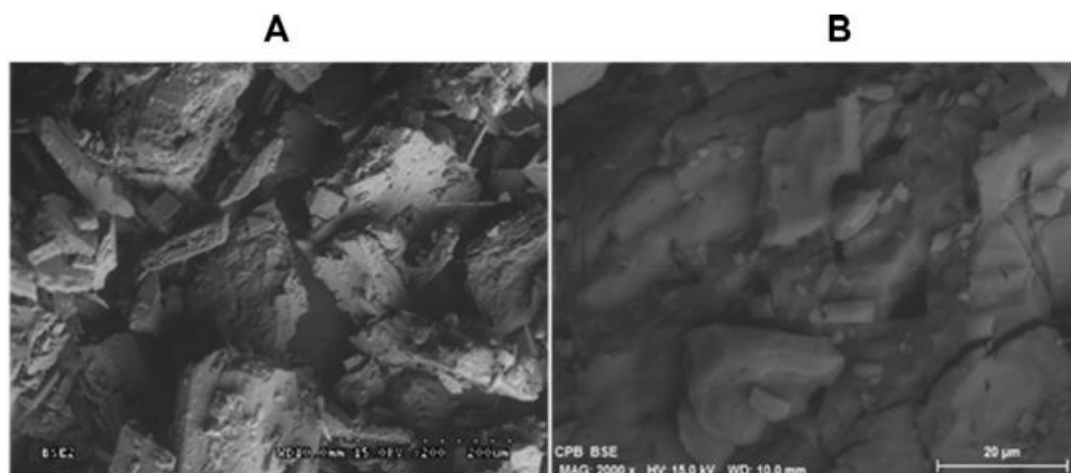


Figura 8.5. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) para el complejo de inclusión CBP+β-CD con 200x (A) y con 2000x (B).

8.3.2. Análisis microbiológicos.

Los cambios en la flora microbiana de la dorada a partir de diferentes tratamientos a lo largo del almacenamiento de hielo se muestran en las Figuras 8.6., 8.7., 8.8. y 8.9. El bajo recuento microbiano inicial de todos los grupos al comienzo del almacenamiento de hielo (día 1) indica una excelente calidad de pescado, aunque todos los recuentos aumentaron durante el período de almacenamiento, principalmente a partir del séptimo día.

Los recuentos de enterobacterias mostraron una carga inicial muy baja, lo que indica buenas prácticas de pesca y manejo. Además, este valor tan bajo indica una buena higiene del medio marino donde se crió y capturó la dorada. De hecho, la contribución de *Enterobacteriaceae* a la microflora de los peces y su posible deterioro debe tenerse en cuenta, especialmente en el caso de agua contaminada o de retraso en el enfriamiento inmediatamente después de la captura (Carrascosa *et al.*, 2015). Los recuentos iniciales de *Enterobacteriaceae* no superaron 1 log UFC / g en los diferentes tratamientos. Todos los recuentos aumentaron durante el tiempo de almacenamiento a partir del día 7 de análisis (Figura 8.7.). Los recuentos de las doradas aturdidas y sacrificadas con CEO+β-CD y almacenadas con hielo CBP+β-CD se encontraban por debajo de los obtenidos por las doradas CTRL HC y CTRL HA (4,5 log UFC / g). Además, la dorada del CTRL HA obtuvo recuentos más bajos que las del CTRL HC durante el tiempo de almacenamiento.

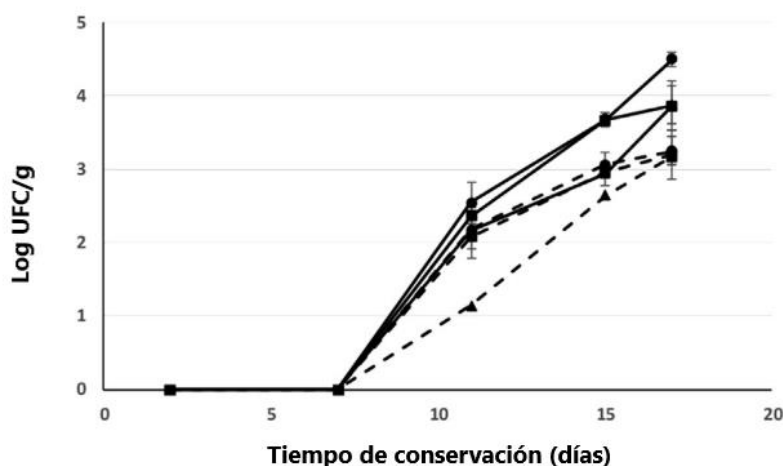


Figura 8.6. Evolución en los recuentos de *Enterobacteriaceae* de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua)

Las *Pseudomonas sp.* son bacterias específicas del deterioro en pescado fresco del Mediterráneo conservado en hielo (Gennari *et al.*, 1999). El recuento inicial de *Pseudomonas sp.* (día 1) fue inferior al límite de detección en todos los tratamientos (Figura 8.7.).

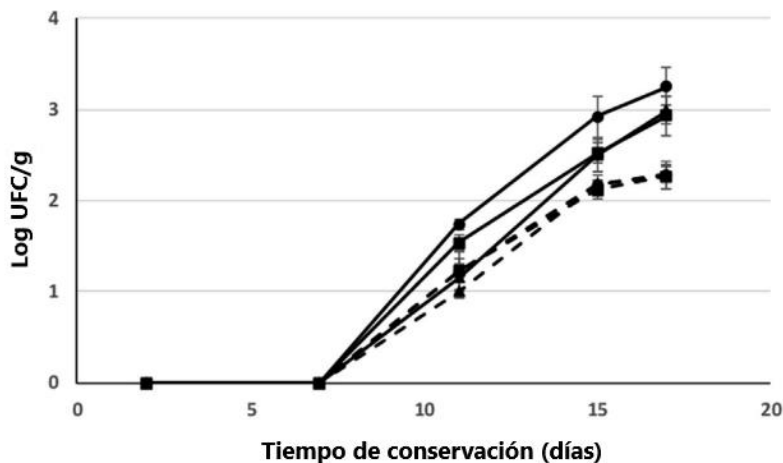


Figura 8.7. Evolución en los recuentos de *Pseudomonas spp.* de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua)

En el día 11 de almacenamiento a 2 °C, el recuento de *Pseudomonas sp.* para las doradas aturdidas y sacrificadas, así como conservadas en hielo normal fue mayor que en los tratamientos en los que se le aplican AEs encapsulados en β -CD. Al final del período de conservación (17 días), las doradas del tratamiento control (CTRL HC) alcanzaron un recuento de 3,25 log UFC / g, mientras que las aturdidas y sacrificadas, así como

conservadas con hielo incluyendo AEs+ β -CD no sobrepasaron valores de 2,3 log UFC / g.

Por lo tanto, la población de *Pseudomonas sp.* se redujo en 1 log UFC / g tras 17 días de almacenamiento. La evolución de *Pseudomonas sp.* durante el almacenamiento de pescado fresco en hielo se ha utilizado como indicador de deterioro del mismo debido a su corto tiempo de generación (Stamatis and Arkoudelos, 2007).

Los bajos recuentos inicial obtenidos en microorganismos aerobios mesófilos totales (AMT) para todos los tratamientos (entre 1 y 2 log UFC / g) indican buena calidad de pescado (Figura 8.8). La carga microbiana de AMT en pescado fresco es una herramienta útil para evaluar su calidad y vida útil.

Durante el período de conservación en hielo de dorada fresca, los recuentos de AMT aumentaron en todos los tratamientos, pero no excedieron los 7 log UFC / g, considerado como el nivel máximo de aceptabilidad para pescado fresco por la Comisión Internacional de Especificaciones Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 1986; Ojagh *et al.*, 2010) excepto en el caso de las doradas del CTRL HC. Las doradas aturcidas y sacrificadas con hielo con CEO+ β -CD obtuvieron recuentos menores de AMT, 6,5 log CFU / g, en comparación con los 7,2 log CFU / g del tratamiento CTRL HC al final del período de almacenamiento (17 días).

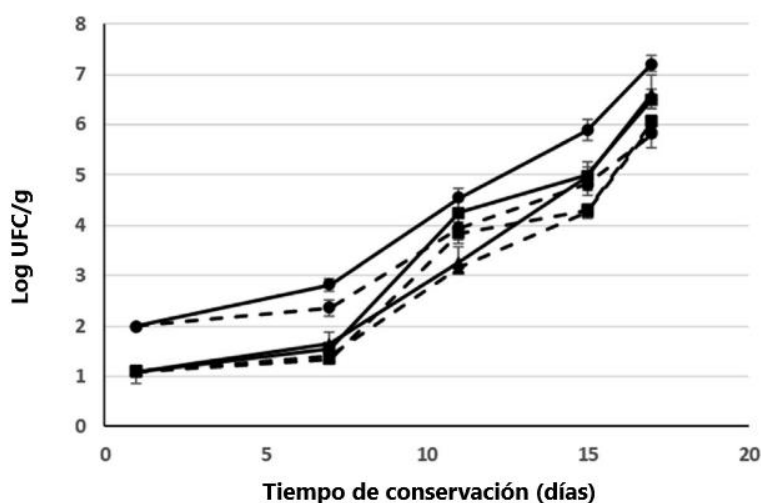


Figura 8.8. Evolución en los recuentos de AMT de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua)

La vida útil de la dorada se determinó utilizando un análisis de regresión para cada tratamiento. Por lo tanto, se estableció una vida útil microbiológica de 18 días para el tratamiento CTRL HC, mientras que la dorada del tratamiento CTRL HA tuvo una mayor vida útil (24 días). Las doradas almacenadas en hielo con AEs+ β -CD aumentaron su vida útil en hasta 4 días. Además, la dorada aturdida / sacrificada con hielo CEO+ β -CD aumentó la vida útil entre 2 y 3 días, con una conservación en hielo normal.

Los bajos recuentos iniciales de microorganismos psicrófilos totales son indicativo de una buena calidad del pescado (Figura 8.9.).

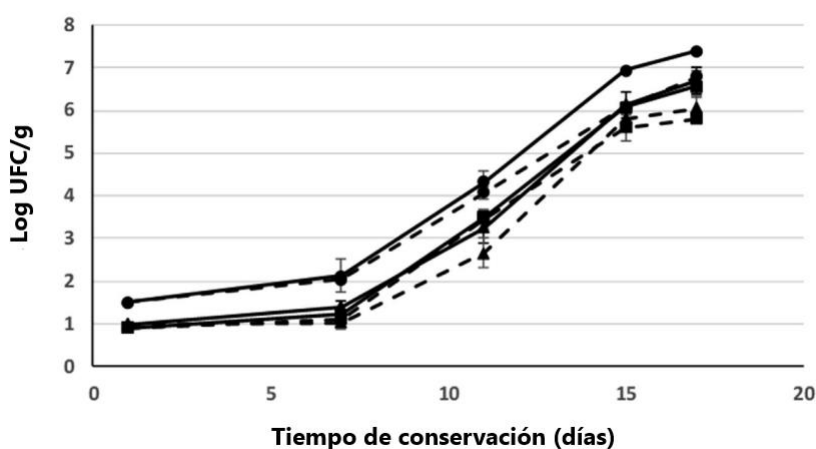


Figura 8.9. Evolución en los recuentos de microorganismos psicrófilos totales de dorada fresca con diferentes tratamientos durante su conservación a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua)

El recuento de psicrófilos obtenido en el CTRL HC superó el valor de 7 log UFC / g a los 15 días de almacenamiento a 2 °C. Sin embargo, las doradas del tratamiento CTRL HA presentaban una carga de psicrófilos que no excedió los 6 log UFC / g a los 17 días.

Los microorganismos psicrófilos son los principales responsables del deterioro aeróbico del pescado almacenado en refrigeración (Ojagh *et al.*, 2010). En el estudio realizado por Tavakoli *et al.* (2018) de conservación de truchas enteras en hielo, los resultados fueron similares. Los grupos de doradas almacenadas en hielo control obtuvieron los valores más altos, mientras que las conservadas con hielo incluyendo AEs presentaron menores recuentos. La diferencia entre el estudio de Tavakoli *et al.* (2018) y nuestro estudio es la dosis de AEs utilizada, siendo nuestra dosis mucho menor (1500 mg / kg frente a 50 mg / kg de hielo). De acuerdo con Carrascosa *et al.* (2015), los recuentos de microorganismos

psicrófilos se consideran mejores para la estimación de la vida útil del pescado refrigerado que los microorganismos mesófilos y $6 \log \text{ UFC / g}$ podrían establecerse como el límite de aceptabilidad (Mol *et al.*, 2007).

Después de estas consideraciones, la vida útil de las doradas control (CTRL HC) se establece en 13 días, mientras que la vida útil de las almacenadas con hielo incluyendo CBP+ β -CD es de 17 días. En cualquier caso, es destacable que las doradas e aturdidas / sacrificadas con hielo CEO+ β -CD presentan una mayor vida útil que las doradas sacrificadas de manera tradicional con hielo normal.

8.3.3. Análisis físico-químicos

▪ Determinación de pH

Los valores de pH en el músculo del pescado son bastante variables durante el almacenamiento post mortem en base a diferentes parámetros como la especie, alimentación, estación y otros factores ambientales. Los resultados de pH iniciales en dorada para todos los tratamientos estudiados oscilaban entre 6,35 y 6,50 y estos valores aumentaron durante el almacenamiento a 2 °C (Tabla 8.1.). El aumento de los valores de pH durante el período de almacenamiento puede deberse a la producción de compuestos básicos nitrogenados, como los compuestos de amoníaco y TMA, por el crecimiento de bacterias típicas de descomposición del pescado (Özyurt *et al.*, 2012). No hubo cambios significativos de pH durante el almacenamiento a 2 °C, y no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

Tabla 8.1. Evolución de pH en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C (n=3 \pm SD).

Aturdido / Sacrificio	Hielo	Días				
		1	7	11	15	17
Control	Control	6,50 \pm 0,02 ^a	6,46 \pm 0,14 ^a	6,25 \pm 0,26 ^a	6,54 \pm 0,01 ^a	6,65 \pm 0,18 ^a
	CBP+ β -CD/kg	6,43 \pm 0,08 ^a	6,45 \pm 0,01 ^a	6,40 \pm 0,12 ^{ab}	6,46 \pm 0,05 ^a	6,52 \pm 0,02 ^a
10 mg CEO+ β -CD/kg	Control	6,47 \pm 0,05 ^a	6,40 \pm 0,05 ^a	6,57 \pm 0,22 ^{ab}	6,49 \pm 0,03 ^a	6,54 \pm 0,05 ^a
	CBP+ β -CD/kg	6,34 \pm 0,04 ^a	6,23 \pm 0,27 ^a	6,69 \pm 0,05 ^b	6,50 \pm 0,06 ^a	6,59 \pm 0,07 ^a
15 mg CEO+ β -CD/kg	Control	6,40 \pm 0,04 ^a	6,39 \pm 0,02 ^a	6,65 \pm 0,06 ^{ab}	6,53 \pm 0,06 ^a	6,54 \pm 0,03 ^a
	CBP+ β -CD/kg	6,42 \pm 0,09 ^a	6,36 \pm 0,03 ^a	6,61 \pm 0,05 ^{ab}	6,43 \pm 0,04 ^a	6,60 \pm 0,07 ^a

Diferentes letras en columnas y filas indican diferencias significativas (p \leq 0,05)

Los valores de pH obtenidos al comienzo del período de almacenamiento fueron similares a los reportados por Kilinc *et al.* (2007) y Cakli *et al.* (2007). Sin embargo, al final de la conservación en hielo, los valores de pH observados fueron más bajos que los obtenidos por esos autores. Todos los valores de pH fueron inferiores a 7,1, valor considerado como indicativo de descomposición (Kilinc *et al.*, 2007).

▪ *Capacidad de retención de agua (CRA)*

Con respecto a la CRA, todos los tratamientos mostraron una disminución en los valores obtenidos a lo largo del tiempo de almacenamiento en hielo. Estos valores de CRA no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) durante el período de conservación (Tabla 8.2.). La pérdida de agua es importante porque los consumidores consideran un exudado en exceso poco atractivo para el consumo. A mayor pérdida de agua, mayor es la cantidad de exudado acumulado. Los valores de CRA oscilaron entre 78 y 81%, lo que está en concordancia con los resultados de otros investigadores (Alasalvar *et al.*, 2001).

Tabla 8.2. Evolución de la CRA en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C ($n=3 \pm SD$).

Aturdido/ Sacrificio	Hielo	Días				
		1	7	11	15	17
Control	Control	79.61 \pm 4.11 ^a	76.67 \pm 1.74 ^a	77.74 \pm 1.67 ^a	79.83 \pm 0.93 ^{ab}	79.35 \pm 2.93 ^a
	CBP+ β -CD/kg	79.67 \pm 1.93 ^a	77.89 \pm 0.73 ^a	78.79 \pm 1.07 ^a	81.61 \pm 0.84 ^{ab}	81.08 \pm 0.33 ^a
10 mg CEO+ β - CD/kg	Control	78.01 \pm 0.26 ^a	78.17 \pm 2.44 ^a	79.36 \pm 0.31 ^a	78.81 \pm 2.11 ^{ab}	74.71 \pm 1.97 ^a
	CBP+ β -CD/kg	78.55 \pm 2.85 ^a	73.86 \pm 0.26 ^a	78.21 \pm 0.58 ^a	84.32 \pm 1.15 ^b	76.75 \pm 0.76 ^a
15 mg CEO+ β - CD/kg	Control	80.30 \pm 2.17 ^a	76.04 \pm 1.33 ^a	77.93 \pm 0.06 ^a	75.78 \pm 3.23 ^a	75.88 \pm 3.25 ^a
	CBP+ β -CD/kg	79.24 \pm 0.33 ^a	76.92 \pm 1.43 ^a	79.53 \pm 1.59 ^a	78.07 \pm 2.18 ^{ab}	75.81 \pm 1.02 ^a

Diferentes letras en columnas y filas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

▪ *Determinación de color*

Las medidas de color durante la conservación de las doradas en hielo y a 2 °C se muestran en la Tabla 8.3. Ocaño-Higuera *et al.* (2011) establecieron que el cambio de color era un parámetro importante para evaluar la calidad del pescado fresco. Los valores de L * aumentaron al final del período de almacenamiento en todos los tratamientos. Otros autores reportaron resultados similares con valores crecientes de L * a lo largo del tiempo de almacenamiento en hielo (Kilinc *et al.*, 2007; Cakli *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para valores de color en los parámetros a * y b * con respecto al tiempo de conservación en hielo.

Tabla 8.3. Evolución en los parámetros de color en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C (n=3±SD).

Parameters	Aturdido	Hielo	Días				
			1	7	11	15	17
L*	Control	Control	81.89 ± 1.65 ^a	76.24 ± 1.48 ^a	83.36 ± 0.58 ^a	86.42 ± 2.10 ^a	80.78 ± 1.94 ^a
		CBP-β-CD	83.56 ± 0.78 ^a	76.59 ± 4.81 ^a	84.90 ± 2.20 ^a	88.05 ± 0.56 ^a	86.34 ± 1.22 ^a
	10 mgCEO-β-CD/kg	Control	81.42 ± 2.92 ^a	74.16 ± 6.29 ^a	81.68 ± 4.11 ^a	88.24 ± 1.39 ^a	82.80 ± 5.37 ^a
		CBP-β-CD	83.39 ± 0.12 ^a	80.03 ± 1.25 ^a	83.48 ± 0.91 ^a	84.14 ± 1.67 ^a	83.05 ± 1.82 ^a
	15 mgCEO-β-CD/kg	Control	80.40 ± 0.66 ^a	80.92 ± 3.26 ^a	83.31 ± 1.69 ^a	87.87 ± 1.04 ^a	84.19 ± 1.92 ^a
		CBP-β-CD	82.73 ± 1.52 ^a	76.63 ± 3.66 ^a	84.29 ± 1.70 ^a	84.30 ± 3.38 ^a	85.59 ± 0.91 ^a
a*	Control	Control	-0.32 ± 0.06 ^{b,c}	-0.50 ± 0.05 ^b	-0.76 ± 0.31 ^{b,c}	-0.81 ± 0.09 ^c	-0.42 ± 0.04 ^c
		CBP-β-CD	-0.24 ± 0.11 ^c	-0.27 ± 0.02 ^c	-0.54 ± 0.15 ^c	-0.80 ± 0.25 ^c	-0.91 ± 0.17 ^a
	10 mgCEO-β-CD/kg	Control	-0.45 ± 0.19 ^{b,c}	-0.58 ± 0.21 ^b	-0.85 ± 0.20 ^{b,c}	-0.98 ± 0.29 ^c	-0.51 ± 0.15 ^{b,c}
		CBP-β-CD	-0.75 ± 0.16 ^b	-0.57 ± 0.21 ^b	-1.01 ± 0.08 ^{a,b,c}	-0.87 ± 0.23 ^c	-0.79 ± 0.16 ^{a,b,c}
	15 mgCEO-β-CD/kg	Control	-0.76 ± 0.16 ^b	-0.23 ± 0.14 ^c	-1.08 ± 0.23 ^{a,b,c}	-0.92 ± 0.28 ^c	-0.81 ± 0.14 ^{a,b}
		CBP-β-CD	-0.27 ± 0.22 ^c	-0.52 ± 0.19 ^b	-1.36 ± 0.06 ^{a,b,c}	-1.17 ± 0.08 ^c	-0.76 ± 0.12 ^{a,b,c}
b*	Control	Control	3.26 ± 0.23 ^{c,d}	3.20 ± 0.06 ^{b,c}	3.35 ± 0.06 ^b	3.51 ± 0.17 ^b	4.21 ± 0.21 ^b
		CBP-β-CD	2.37 ± 0.11 ^b	3.08 ± 0.01 ^c	3.18 ± 0.07 ^b	3.35 ± 0.08 ^c	4.07 ± 0.27 ^b
	10 mgCEO-β-CD/kg	Control	3.92 ± 0.29 ^d	3.91 ± 0.39 ^{a,b}	3.76 ± 0.04 ^c	4.07 ± 0.31 ^a	3.50 ± 0.10 ^a
		CBP-β-CD	2.70 ± 0.43 ^{b,c}	3.23 ± 0.26 ^a	3.41 ± 0.07 ^c	3.51 ± 0.09 ^b	3.98 ± 0.14 ^b
	15 mgCEO-β-CD/kg	Control	2.90 ± 0.10 ^{b,c}	3.00 ± 0.12 ^a	1.05 ± 0.32 ^a	3.78 ± 0.15 ^b	3.35 ± 0.17 ^a
		CBP-β-CD	2.34 ± 0.13 ^b	3.50 ± 0.44 ^a	2.97 ± 0.07 ^a	3.31 ± 0.06 ^c	4.37 ± 0.19 ^b

Diferentes letras en columnas y filas indican diferencias significativas (p≤0,05)

▪ **Determinación del nitrógeno de trimetilamina (N-TMA)**

La evolución del análisis de TMA-N durante el período de almacenamiento se muestra en la Tabla 8.4. El valor TMA-N se usa como indicador de calidad en pescado, ya que la concentración de TMA-N obtenida es un factor limitante de aceptabilidad como pescado fresco. Según la FAO (1986), se establece un valor de N-TMA de 1 mg / 100 g para pescado fresco. Los valores iniciales de TMA-N (día 1) estaban entre 0,15 y 0,4 mg / 100 g y sus niveles permanecieron bastante bajos durante el período de almacenamiento. Hacia el final de la conservación (día 17), los valores de TMA-N aumentaron en todas las condiciones. Los resultados presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las doradas del tratamiento CTRL y las tratadas con AEs+ β -CD (tanto hielo para aturdido / sacrificio como para conservación).

Tabla 8.4. Evolución de los valores de N-TMA en doradas enteras frescas envasadas en hielo durante su conservación a 2 °C ($n=3 \pm SD$).

Aturdido / Sacrificio	Hielo	Días				
		1	7	11	15	17
Control	Control	0,39 \pm 0,04 ^a	0,42 \pm 0,01 ^c	0,44 \pm 0,01 ^b	0,45 \pm 0,02 ^b	0,52 \pm 0,01 ^b
	CBP+ β -CD/kg	0,37 \pm 0,05 ^a	0,32 \pm 0,01 ^b	0,32 \pm 0,01 ^a	0,35 \pm 0,01 ^a	0,41 \pm 0,03 ^a
10 mg CEO+ β -CD/kg	Control	0,30 \pm 0,24 ^a	0,31 \pm 0,03 ^{ab}	0,37 \pm 0,01 ^{ab}	0,41 \pm 0,02 ^a	0,37 \pm 0,02 ^c
	CBP+ β -CD/kg	0,30 \pm 0,14 ^a	0,30 \pm 0,02 ^{ab}	0,39 \pm 0,03 ^{ab}	0,40 \pm 0,08 ^a	0,41 \pm 0,07 ^a
15 mg CEO+ β -CD/kg	Control	0,30 \pm 0,03 ^a	0,29 \pm 0,02 ^{ab}	0,43 \pm 0,03 ^b	0,36 \pm 0,04 ^a	0,34 \pm 0,07 ^c
	CBP+ β -CD/kg	0,15 \pm 0,18 ^a	0,23 \pm 0,01 ^a	0,34 \pm 0,01 ^a	0,35 \pm 0,02 ^a	0,43 \pm 0,08 ^a

Diferentes letras en columnas y filas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Se detectaron valores más altos en dorada sacrificada y almacenada con hielo control. Estos valores fueron inferiores a los encontrados para dorada almacenada en hielo en líquido y hielo picado a 4 °C (Kilinc *et al.*, 2007), y conservadas a 5 °C (Cakli *et al.*, 2007). Huidobro *et al.* (2001) también encontraron un leve aumento en los valores de N-TMA durante el período de conservación en hielo a 2 °C y concluyeron que los valores de N-TMA no eran un buen indicador de frescura en las especies *Spararidae*. Otros autores estuvieron de acuerdo con ellos y consideraron que los valores de N-TMA mostraban alteraciones muy avanzadas del pescado y no lo consideran fiables para evaluar el proceso de deterioro (Özogul *et al.*, 2007).

8.3.4. Evaluación sensorial

Los panelistas evaluaron los cambios sensoriales de las doradas durante todo el almacenamiento en hielo y a 2 °C (Figura 8.10.). La evaluación del pescado se realizó utilizando el sistema de la Unidad de Investigación de Alimentos de Tasmania (TRFU) modificado por Cakli *et al.* (2007) y Erikson *et al.* (2019), y desarrollado como método de índice de calidad (QIM). La puntuación QIM total modificada varió de 0 (pescado muy fresco) a 40 (pescado deteriorado).

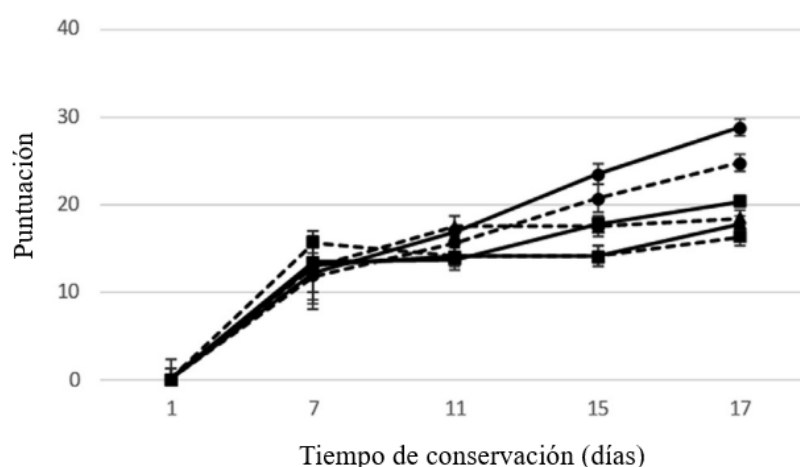


Figura 8.10. Evaluación sensorial de las doradas frescas con diferentes tratamientos durante su conservación en hielo y a 2 °C. CTRL HC (—●—); CTRL HA (---●---; línea discontinua); T10 HC (—■—); T10 HA (---■---; línea discontinua); T15 HC (—▲—); T15 HA (---▲---; línea discontinua).

Al comienzo del período de almacenamiento (día 1), los panelistas encontraron olor y atributos típicos de pescado fresco en la dorada cruda para todas las condiciones estudiadas, lo que indica la máxima calidad y frescura de las muestras. A los 15 días de conservación fue cuando se encontraron diferencias en las características sensoriales del pescado. El día 15 de análisis, las doradas del tratamiento control (CTRL HC) presentaba las peores puntuaciones en los atributos analizados: la piel no presentaba brillo, los ojos cóncavos y la córnea opaca, las branquias tenían una coloración marrón y emitían olor a pescado deteriorado. Por lo tanto, la vida útil estimada para el control de las doradas para el tratamiento CTRL HC podría ser de 13 días. Sin embargo, a los 17 días de conservación, las doradas de los tratamientos que incluyen AEs+ β -CD (tanto en el aturdido / sacrificio, como en el hielo de conservación) fueron sensorialmente puntuadas como aceptables, pero en el límite de aceptabilidad. De esta manera, se muestra que, en

este caso, el recuento de microorganismos psicrófilos es más útil para estimar la vida útil del pescado que los recuentos de AMT. Según los panelistas, no se detectaron aromas relacionados con los AEs durante todo el período de almacenamiento. Por lo tanto, los panelistas no detectaron diferencias entre las muestras conservadas en hielo control y las conservadas en hielo con AEs+ β -CD. Así, el hielo con AEs+ β -CD (utilizado con dosis bajas tanto en aturrido / sacrificio como en conservación) no tuvo ningún efecto adverso sobre la aceptabilidad sensorial de las doradas.

Se encontraron resultados similares en dorada cocinada (datos no mostrados). Los panelistas evaluaron peor la dorada del tratamiento control durante todo el almacenamiento en refrigeración. Ni el olor ni el sabor de las doradas de los tratamientos T10 y T15+HA (sacrificada y almacenada en hielo con AEs+ β -CD) afectaron de manera negativa durante su evaluación sensorial al ser cocinadas. Los panelistas no detectaron olores y/o sabores desagradables relacionados con los aromas de los AEs. Por lo tanto, el uso de hielo con AEs- β -CD tanto para aturrido / sacrificio, como para conservación, no afecta las características sensoriales de la dorada fresca y cocinada, cuando se usan dosis bajas, como se lleva a cabo en este trabajo.

8.4. Conclusiones

Los resultados de este trabajo mostraron que la aplicación del hielo CEO+ β -CD durante el aturrido / sacrificio con o sin el uso de hielo con CBP+ β -CD durante la conservación, mejoró la calidad y la frescura de las doradas y extendió su vida útil.

La aplicación de AEs+ β -CD en el hielo mejoró los parámetros microbiológicos y algunos fisicoquímicos a lo largo del tiempo de almacenamiento. Las doradas sacrificadas o almacenadas en hielo que incluyen los AEs encapsulados, mostraron valores microbiológicos y físicoquímicos más bajos debido a las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales. De hecho, la vida útil microbiológica se estableció en 18 días para las doradas del tratamiento CTRL HC, mientras que las doradas sacrificadas y conservadas en hielo antimicrobiano tuvo una vida útil entre 4 y 6 días más.

Según los resultados de los análisis sensoriales, hasta el día 15, todas las condiciones se determinaron como pescado fresco, pero el día 17 las muestras del tratamiento CTRL HC

ya no era aceptable para el consumo. El hielo con antimicrobiano CBP+ β -CD evita atributos sensoriales desagradables y mejora la aceptabilidad sensorial.

Por lo tanto, la aplicación de CEO+ β -CD durante el aturcido / sacrificio, en combinación con el almacenamiento en hielo de la dorada no mostró sabores ni olores desagradables durante el período de almacenamiento.

En este sentido, el hielo antimicrobiano incluyendo CBP+ β -CD puede ser una buena opción para la industria pesquera, con el objetivo de extender la vida útil de las especies marinas, debido a los efectos beneficiosos y al bajo precio del hielo picado con AEs+ β -CD incluidos.

CAPÍTULO 9

Validación de la tecnología de conservación con hielo antimicrobiano sobre la calidad y vida útil de Lubina, Trucha arcoíris y Salmón.

CAPÍTULO 9. VALIDACIÓN DE LA TECNOLOGÍA DE CONSERVACIÓN CON HIELO ANTIMICROBIANO SOBRE LA CALIDAD Y VIDA ÚTIL DE LUBINA (*Dicentrarchus labrax*), TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*) Y SALMÓN (*Salmo salar*).

9.1. Introducción

Al igual que la dorada (especie estudiada en capítulos anteriores), existen otras especies de interés comercial a nivel nacional y mundial como la lubina, trucha arcoíris y salmón (APROMAR, 2019). Estas especies despiertan un gran interés por los consumidores debido a su alto valor nutricional y a sus atractivas características organolépticas (Jain *et al.*, 2007; FAO, 2018; MAPAMA, 2015).

Debido a que el pescado conservado en fresco es muy susceptible a alteraciones de degradación en su estructura, la metodología de conservación es de vital importancia para preservar su calidad y seguridad (Gokoglu and Yerlikaya, 2015). Como se ha comentado en los capítulos 7 y 8, el hielo es el método de conservación de pescado fresco más utilizado en la industria pesquera debido a su alta eficiencia de enfriamiento, bajo coste y alta disponibilidad (López-Cánovas *et al.*, 2019). Esta técnica de conservación puede ser optimizada mediante su combinación con aceites esenciales (AEs) incluyéndolos en el hielo como agentes antimicrobianos naturales generando así un envasado activo para prolongar la vida útil de los productos frescos (Bensid *et al.*, 2014; Tavakoli *et al.*, 2018).

El efecto de la conservación en hielo, aplicando o no AEs, sobre la calidad de diferentes especies ha sido evaluado por diversos autores obteniendo resultados positivos y alargando su vida útil (Ocaño-Higuera *et al.*, 2011; Attouchi and Sadock, 2012; Silbande *et al.*, 2016; Hassoun y Çoban, 2017; Gokoglu, 2018). Por el contrario, los estudios que aplicaron AEs mostraron fuertes olores en el hielo y éstos fueron transferidos al producto y percibidos sensorialmente de forma negativa por los evaluadores en el análisis de calidad QIM (Ozyurt *et al.*, 2012; Bensid *et al.*, 2014; Tavakoli *et al.*, 2018).

Las características desfavorables del pescado atribuidas a los AEs por su aplicación en altas dosis en el hielo, pueden ser disminuidas mediante la encapsulación de los AEs en β -ciclodextrinas (oligosacáridos cíclicos) evitando así aromas desagradables y pérdidas de volatilidad por su liberación progresiva (Kostaki *et al.*, 2009; Fenyvesi *et al.*, 2016).

Este capítulo tiene como objetivo la validación de la tecnología de conservación con hielo antimicrobiano en distintas especies de interés en acuicultura, como son la lubina (*Dicentrarchus labrax*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y salmón (*Salmo salar*), evaluando el efecto sobre su calidad y vida útil. El hielo antimicrobiano utilizado tendrá las mismas características de fabricación que el estudiado en capítulos anteriores, usando la misma combinación de AEs (Carvacrol-Bergamota-Pomelo, en la proporción 3:1:1) encapsulados formando el complejo de inclusión β -CD+CBP, y aplicándose según diferentes concentraciones en este hielo antimicrobiano.

9.2. Plan experimental

En este estudio se ha llevado a cabo la evaluación de las siguientes condiciones de envasado y conservación de las especies lubina, trucha y salmón enteras frescas (Figura 9.1.).

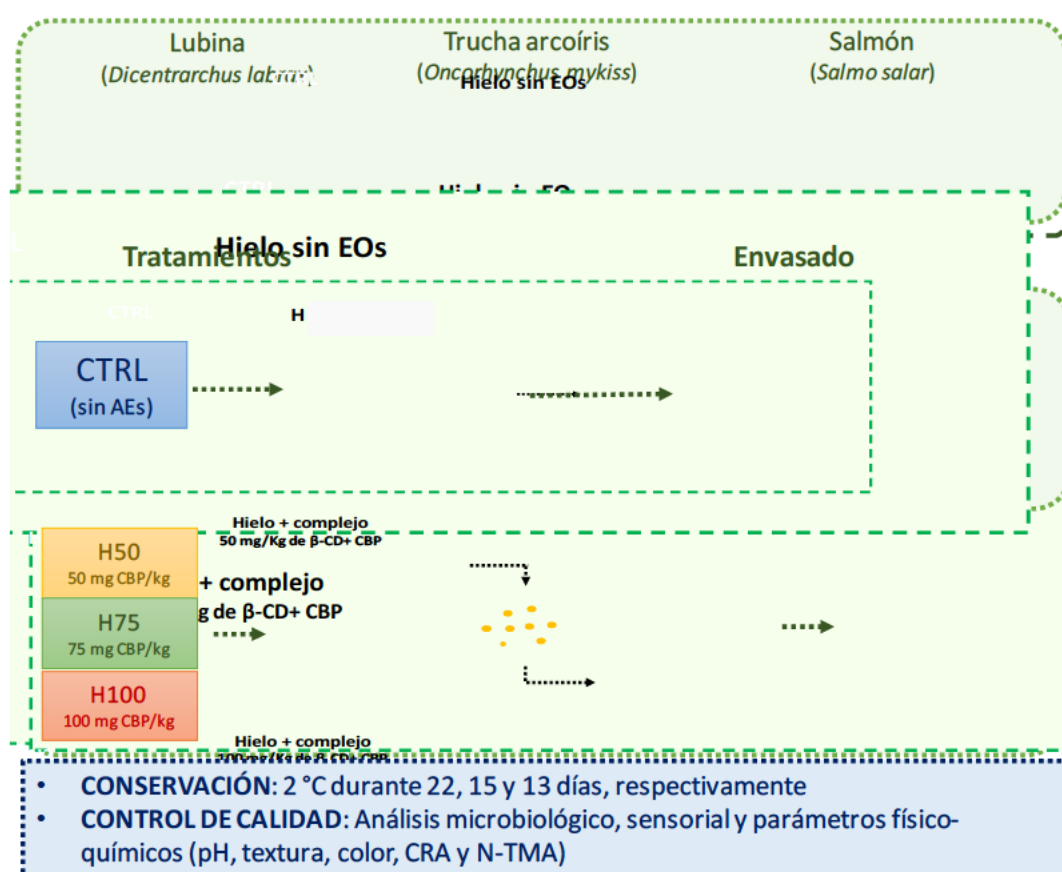


Figura 9.1. Plan experimental desarrollado para el estudio de determinación de la vida útil de lubina, trucha arcoíris y salmón enteros conservados en hielo y a 2 °C.

Los tratamientos de envasado en hielo se estructuraron como se detalla a continuación:

- **CTRL**: almacenamiento en hielo picado sin aditivo.
- **H50**: almacenamiento en hielo picado con AEs en dosis de 50 mg/kg de β -CD+ CBP.
- **H75**: almacenamiento en hielo picado con AEs en dosis de 75 mg/kg de β -CD+ CBP.
- **H100**: almacenamiento en hielo picado con AEs en dosis de 100 mg/kg de β -CD+ CBP.

Las piezas de lubina, trucha arcoíris y salmón necesarias para realizar estos experimentos tenían un peso medio de 650 ± 50 g, 750 ± 50 g y 2000 ± 50 g respectivamente.

Se realizaron análisis de microbiología y parámetros físico-químicos: pH, capacidad de retención de agua, color, textura y nitrógeno de trimetilamina (N-TMA). Además de un análisis sensorial de las doradas enteras frescas y cocinadas en diferentes días de almacenamiento.

La temperatura de conservación refrigerada fue de 2 °C y el muestreo se realizó en días diferentes para las distintas especies estudiadas:

- Lubina (*Dicentrarchus labrax*): los días 0, 6, 13, 15, 19 y 22
- Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*): 0, 6, 13 y 15.
- Salmón (*Salmo salar*): 0, 6 y 13.

La variabilidad del período de conservación dependió de la vida útil de cada una de las especies.

9.3. Resultados y discusión

En este apartado se muestran los resultados más significativos obtenidos para todos los parámetros analizados para cada una de las especies estudiadas.

9.3.1. *Análisis microbiológico*

LUBINA (*Dicentrarchus labrax*)

El análisis microbiológico mostró un recuento inicial de *Enterobacteriaceae spp.* y *Pseudomonas sp.* de 2,5 y 1 log UFC/g respectivamente (Figura 9.2). Estos recuentos fueron aumentando durante todo el período de conservación para todos los tratamientos aplicados. Papadopoulos *et al.* (2003) obtuvieron valores iniciales similares en lubina conservada en hielo.

La Figura 9.2.A muestra que los recuentos de enterobacterias durante la mayor parte de la vida útil de las lubinas fueron menores en las muestras almacenadas con hielo antimicrobiano (dosis de 75 y 100 mg AEs / kg) con diferencias significativas ($p < 0,05$) de más de 2 log UFC/g con respecto a los tratamientos CTRL y H50. Desde el día 15 hasta el final del período de conservación no hubo diferencias significativas entre todas las condiciones estudiadas.

El desarrollo de *Pseudomonas sp.* durante el periodo de conservación no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de hielo aplicados, pero sí con respecto al tiempo de conservación mostrando un aumento en los recuentos a partir del día 13 de análisis con valores en torno a 3,5 log UFC/g y llegando a valores de 5 log UFC/g como valores máximos alcanzados al final del periodo de conservación (Figura 9.2.B).

En otros estudios, la evolución de estas bacterias alterantes a lo largo de la conservación de pescado fresco en hielo ha sido utilizada como indicador de deterioro del mismo debido a su rápido crecimiento al alcanzar ese estado de deterioro (Stamatis y Arkoudelos, 2007).

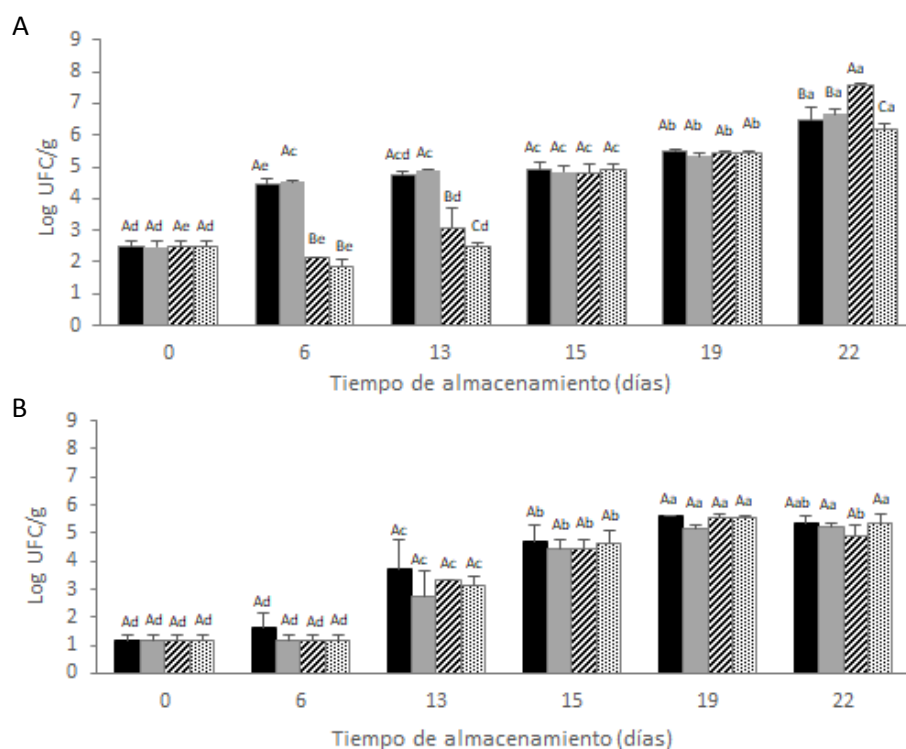


Figura 9.2. Evolución de la carga de *Entobacteriaceae* spp. (A) y *Pseudomonas* sp. (B) en lubinas enteras durante su período de conservación en hielo y a 2 °C ($n=3\pm SD$). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

Al comienzo del tiempo de almacenamiento, el recuento de los microorganismos aerobios mesófilos (AMT) y psicrófilos fue de 4 log UFC/g (Figura 9.3). La carga inicial es elevada pero otros autores reportaron valores similares en la misma especie e informaron que puede ser debido al tipo de especie y las características ambientales que envuelven su crianza (Kilinc *et al.* 2007; Tejada and Huidobro, 2002)

Los recuentos de AMT (Figura 9.3.A) mostraron un aumento progresivo hasta el final de la conservación a 2 °C obteniendo el CTRL valores superiores con respecto a los tratamientos con hielo antimicrobiano. Las muestras del CTRL excedieron los 7 log UFC/g en el día 22 de conservación, valor considerado como límite máximo de aceptación en pescado conservado en hielo (ICMSF, 1986). Los tratamientos con AEs encapsulados mostraron recuentos altos al final del período de almacenamiento sin sobrepasar este límite y sin presentar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los mismos.

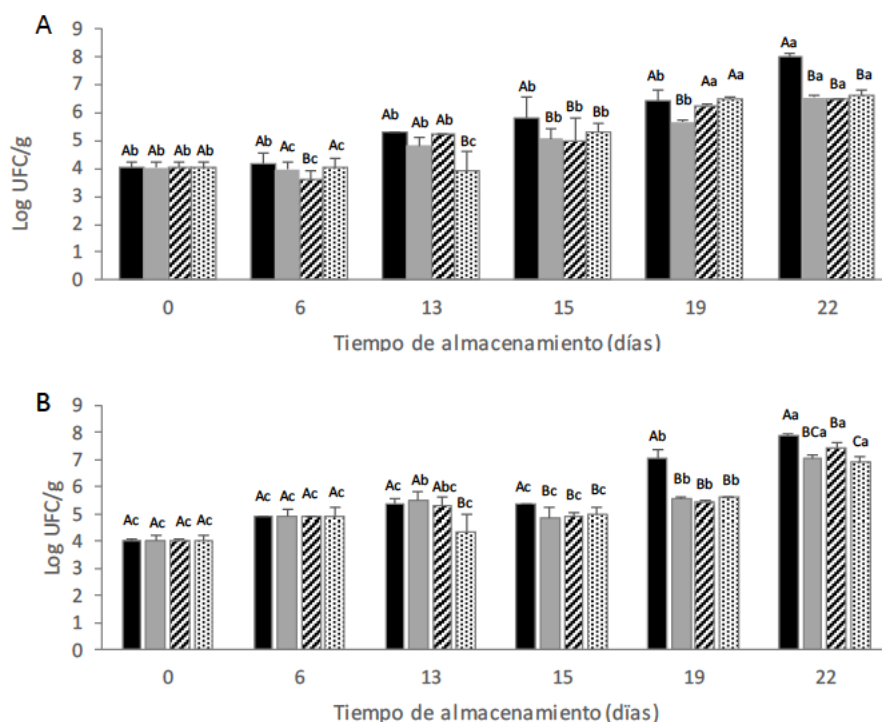


Figura 9.3. Evolución de la carga de AMT (A) y Psicrófilos (B) en lubinas enteras durante su periodo de conservación en hielo y a 2 °C ($n=3\pm SD$). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

Los microorganismos psicrófilos mostraban valores iniciales similares a los obtenidos por los AMT (Figura 9.3. B). La carga de estos microorganismos experimentó un aumento durante todo el periodo de conservación sin presentar diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos hasta el día 13, en el que el tratamiento H100 obtiene los valores más bajos manteniéndose hasta el último día de análisis. El tratamiento CTRL mostró los valores más altos con respecto a las lubinas conservadas con hielo antimicrobiano a partir del día 15 de conservación, excediendo a los 19 días los 6 log UFC/g que es el límite legal establecido para pescado fresco (Erkan, 2007).

Según la evolución de microorganismos mostrada en este estudio, determinamos que el límite de vida útil fue alcanzado a los 15 días por las muestras de lubina del tratamiento CTRL, frente a los 21 días para las muestras conservadas en hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) consiguiendo una extensión de su vida útil de 6 días (incremento del 40%).

TRUCHA ARCOIRIS (*Oncorhynchus mykiss*)

Las truchas arcoiris mostraron una carga microbiológica muy baja en el día 0 de conservación. *Enterobacteriaceae spp.* y *Pseudomonas sp.* presentaban una carga inicial de 1 log UFC/g, valores inferiores a los reportados por Chytiri *et al.* (2004) con recuentos de 3,5 log UFC/g. Sin embargo, los microorganismos aerobios psicrófilos y mesófilos totales (AMT) estaban entre 2 y 3 log UFC/g.

Estos valores obtenidos en la microbiología inicial de las muestras son indicativos de buenas prácticas de captura y manejo. En todos los tratamientos se observó un aumento de la población microbiana analizada con diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al factor tiempo de conservación

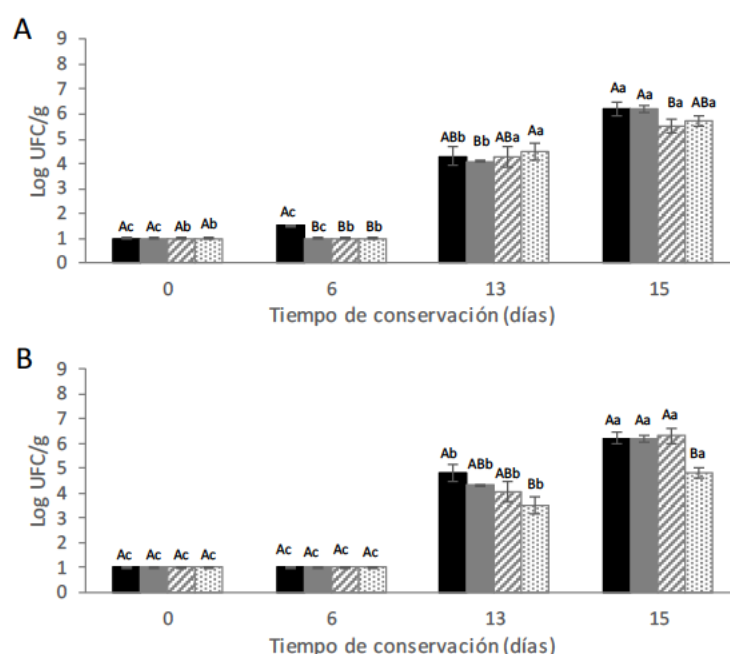


Figura 9.4. Evolución de la carga de *Enterobacteriaceae spp.* (A) y *Pseudomonas sp.* (B) en truchas arcoiris enteras durante su período de conservación en hielo y a 2 °C ($n=3 \pm SD$). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

La evolución de las enterobacterias durante los 15 días de almacenamiento a 2 °C se muestra en la Figura 9.4.A. Hasta el día 13, la carga microbiana se mantuvo en niveles muy bajos para todos los tratamientos aplicados y, a partir de ese día los recuentos aumentaron en todas las muestras durante el período de conservación. En el día 15 de

almacenamiento, las truchas almacenadas en hielo antimicrobiano con dosis de 75 y 100 mg de AEs / kg (H75 y H100) mostraron recuentos más bajos de *Enterobacteriaceae* que las truchas del CTRL con valores en torno a 6 Log UFC/g como los obtenidos por Chytiri *et al.* (2004) en trucha entera y fileteada conservada en hielo.

Al igual que en las enterobacterias, los recuentos de *Pseudomonas sp.* mostraron un aumento en todos los tratamientos a partir del día 13 de conservación (Figura 9.4.B), aunque las muestras almacenadas con hielo antimicrobiano obtuvieron recuentos más bajos con respecto al CTRL, entre 1 y 1,3 ciclos logarítmicos menos ($p < 0,05$). Tanto en el día 13 como en el día 15 de almacenamiento, las truchas conservadas con hielo antimicrobiano H100 (dosis de 100 mg AE / kg de hielo) mostraron los recuentos más bajos con valores inferiores a 5 log UFC/g, presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los demás tratamientos. Los resultados obtenidos para los tratamientos CTRL, H50 y H75 en el último día de análisis fueron similares entre sí y mostraron concordancia con los obtenidos por Carrascosa *et al.* (2013) en los análisis de músculo, piel y agallas en dorada entera al final de su conservación en hielo normal.

Los recuentos obtenidos para microorganismos aerobios mesófilos y psicrófilos totales (datos no mostrados) también mostraron un aumento durante todo el período de conservación ($p < 0,05$), pero no presentaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados. Tavakoli *et al.* (2018) también encontraron unos recuentos iniciales similares para estos microorganismos, así como un aumento de su crecimiento en muestras de trucha a lo largo del almacenamiento en hielo con AEs. Todos los tratamientos excedieron los valores máximos establecidos para pescado fresco en el análisis de ambos microorganismos en el día 15 de conservación, determinando así su vida útil. Valores similares obtuvieron autores como Ozogul *et al.* (2017) para filetes de trucha conservados en hielo y tratados con nanoemulsión de AEs con una vida útil de 14 días para muestras no tratadas y 17 días para los filetes tratados. Rodrigues *et al.* (2016) obtuvieron una vida útil de 11 días para truchas conservadas en MAP + radiación UV-C y 5 días para las envasadas en MAP con aire sintético. Y Ojagh *et al.* (2009) consiguieron una vida útil de 16 días en truchas tratadas con un revestimiento de quitosano enriquecido con AEs frente a los 12 días para las muestras no tratadas y conservadas en refrigeración a 4 °C.

SALMÓN (*Salmo salar*)

Todos los microorganismos analizados para cada uno de los tratamientos estudiados presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al factor tiempo, ya que durante todo el período de conservación la carga microbiológica experimentó un aumento progresivo. En cambio, sólo los grupos de microorganismos aerobios mesófilos y psicrofílos totales presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores obtenidos comparando entre los distintos tratamientos de hielo aplicados en la conservación de salmón entero fresco.

Los recuentos iniciales de *Enterobacteriaceae spp.* y *Pseudomonas sp.* fueron muy bajos (1,2 y 1 log UFC/g, respectivamente), lo que se traduce en un buen manejo de captura y procesamiento del pescado. Estos microorganismos experimentaron un incremento durante el período de almacenamiento independientemente del tratamiento de hielo aplicado (Datos no mostrados).

La Figura 9.5.A muestra la evolución de los microorganismos aerobios mesófilos (AMT) a lo largo del tiempo de almacenamiento. La carga inicial de estos microorganismos fue de 3,5 log UFC / g y a lo largo del tiempo de almacenamiento los recuentos aumentaron progresivamente para todos los tratamientos. Estos valores iniciales son similares a los reportados por Sveinsdottir *et al.* (2002) en piel de salmón entero conservado en hielo (0-2 °C) y Fagan *et al.* (2004) en porciones de salmón envasadas en MAP. El día 13, el salmón almacenado con hielo antimicrobiano (dosis de 100 mg AEs / kg de hielo) no excedió los 7 log UFC, valor considerado como el nivel máximo de aceptabilidad para el pescado fresco (ICMSF, 1986), presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los otros tratamientos.

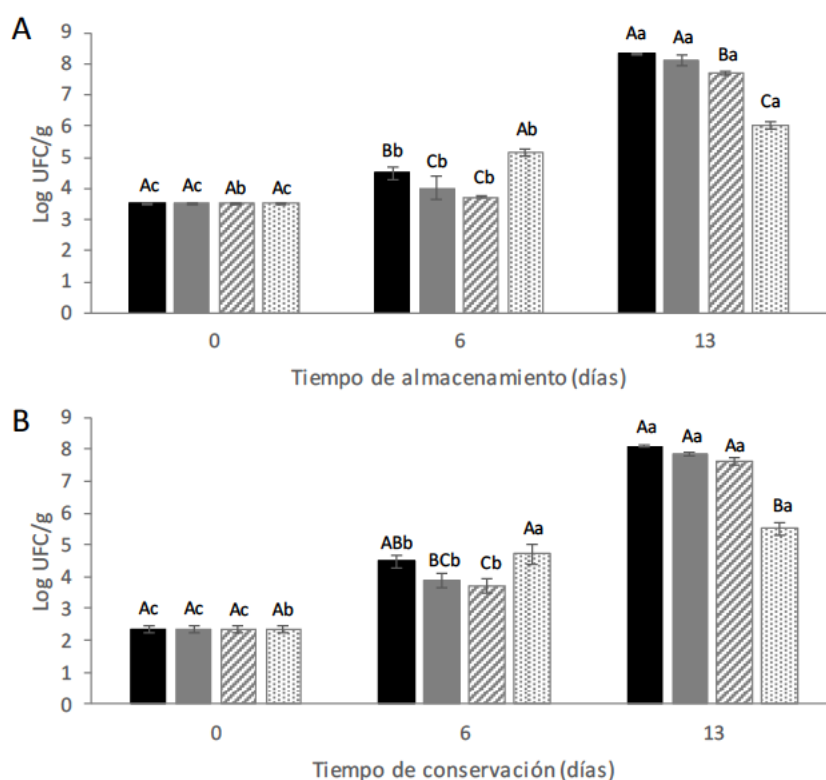


Figura 9.5. Evolución de la carga de AMT (A) y Psicrófilos (B) en salmones enteros durante su período de conservación en hielo y a 2 °C ($n=3\pm SD$). CTRL (barras negras), H50 (barras grises), H75 (barras ralladas) y H100 (barras punteadas). Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

La carga inicial que presentaron los microorganismos psicrófilos totales fue de 2,5 log UFC/g (Figura 9.5. B). Los recuentos aumentaron a lo largo del tiempo de almacenamiento. A los 6 días de conservación, los tratamientos H50 y H75 obtuvieron valores inferiores comparándolos con los CTRL y H100 con diferencias significativas ($p < 0,001$). El tratamiento H100 presentó diferencias significativas ($p < 0,01$) al final del período de conservación con respecto a los demás tratamientos estudiados. El día 13, los salmones conservados en hielo normal (CTRL) y hielo antimicrobiano (dosis de 50 y 75 mg de AEs / kg) excedieron el valor de 6 log UFC/g, considerado como el nivel máximo de aceptabilidad para el pescado fresco (Mol *et al.*, 2007; Erkan, 2007), mientras que los salmones almacenados en hielo con 100 mg de AEs / kg quedaron en el límite sin excederlo. Ojagh *et al.* (2010) consideraron que los microorganismos psicrófilos son los principales responsables del deterioro aeróbico del pescado almacenado en refrigeración, por lo que la población de estos microorganismos puede ser un buen indicativo de calidad del pescado fresco (Carrascosa *et al.*, 2015). Por lo tanto, aplicando el modelo de

regresión lineal con los valores obtenidos en cada tratamiento se determina que la vida útil como límite de aceptabilidad para salmón conservado en hielo antimicrobiano es de 14, 10 y 9 días, para las dosis H100, H75 y H50, respectivamente, frente a los 8 días del tratamiento CTRL.

9.3.2. *Análisis físico-químicos*

Los parámetros físico-químicos que se llevaron a cabo fueron los que se mencionan en el plan experimental siendo los mismos para cada una de las especies. En este apartado se muestran los resultados de aquellos parámetros analizados que presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de hielo aplicados durante el período de conservación de las muestras a 2 °C para cada una de las especies estudiadas.

- ***Determinación de pH***

Este parámetro no presentó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre tratamientos independientemente de la especie estudiada (datos no mostrados). Los valores iniciales de pH fueron de 6,8, 6,63 y 6,58 para lubina, trucha arcoíris y salmón, respectivamente. El pH en las muestras de salmón se mantuvo en unos niveles estables durante todo el período de conservación. Chan *et al.* (2019) reportaron también una evolución estable de pH analizado en músculo de salmón entero y fileteado con valores de 6,4 a los 16 días de conservación en hielo. En cambio, las muestras de lubina y trucha sí obtuvieron diferencias significativas con respecto al tiempo de conservación ($p < 0,05$), ya que se observó un leve aumento de 0,2 unidades al final del período de almacenamiento, con valores finales en torno a 7, los cuales están en concordancia con los obtenidos por otros autores en trucha (Chytiri *et al.*, 2004; Ozogul *et al.*, 2017) y lubina (Özogul *et al.*, 2016; Papadopoulos *et al.*, 2003) almacenadas en hielo.

- ***Capacidad de retención de agua en el músculo (CRA)***

Los resultados obtenidos en el análisis de este parámetro en muestras de lubina y trucha se mostraron bastante estables durante todo el período de conservación manteniéndose en el rango de pescado fresco establecido entre un 70-80 % (Campus *et al.*, 2010; Hernández *et al.*, 2009) sin presentar diferencias significativas ni entre tratamientos ni con respecto al tiempo de conservación.

En salmón, todos los tratamientos presentaron una disminución en los resultados de CRA durante el tiempo de conservación, aunque no existieron diferencias significativas ($p>0,05$) entre ellos. El tratamiento H100 (100mg CBP+ β -CD/kg hielo) fue el que obtuvo mayor CRA en el día 6 de conservación. Con respecto al factor tiempo, fue el tratamiento CTRL el que presentó diferencias significativas ($p<0,05$) (Tabla 9.1). En el último día de conservación (día 13) el tratamiento CTRL alcanza el valor más bajo de todo el período de conservación, siendo éste inferior al 70% de CRA. La pérdida de agua en el músculo se relaciona con el deterioro del pescado, por lo que un bajo porcentaje de CRA es indicativo de pérdida de calidad del mismo (Álvarez *et al.*, 2012).

Tabla 9.1. Evolución de la CRA en salmón entero durante su conservación en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50mg AEs/kg (H50), de 75mg AEs/kg (H75) y de 100mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C ($n=3\pm SD$).

Tratamiento	Tiempo de conservación (días)		
	0	6	13
CTRL	84,06 \pm 9,03 ^a	75,01 \pm 0,70 ^{ab}	68,00 \pm 2,73 ^b
H50	84,06 \pm 9,03 ^a	76,64 \pm 0,67 ^a	74,79 \pm 0,21 ^a
H75	84,06 \pm 9,03 ^a	77,17 \pm 2,09 ^a	74,50 \pm 2,79 ^a
H100	84,06 \pm 9,03 ^a	81,77 \pm 6,30 ^a	73,22 \pm 0,56 ^a

Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

• *Análisis de Color*

Costa *et al.* (2012) sugieren que los parámetros de color están relacionados con las características sensoriales del pescado y se consideran indicadores de calidad y frescura. Aunque los valores L^* , a^* y b^* son determinados mediante un equipo electrónico, estos valores pueden asemejarse a los percibidos por los panelistas en el análisis sensorial de los atributos generales en muestras de pescado (Olafsdottir *et al.*, 2004; Li-Tsang *et al.*, 2003).

En este estudio, se obtuvieron valores bastante estables para todos los parámetros de color (L^* , a^* y b^*) durante todo el período de almacenamiento para todas las especies estudiadas, sin encontrar diferencias significativas ($p>0,05$) entre tratamientos de hielo aplicados ni con respecto al tiempo de conservación (Datos no mostrados). Los cambios de color en el pescado se asocian al deterioro en la apariencia debido a la pérdida de

luminosidad, acumulación de mucus sobre la piel y crecimiento microbiano (Siverstik, 1990).

- ***Análisis de perfil de Textura (TPA)***

La textura de un alimento se obtiene a partir de la medición de un conjunto de parámetros que están estrechamente relacionados con la evaluación sensorial del mismo para la determinación de su calidad y frescura (Cheng *et al.*, 2014; Lepetit, 2007). Los parámetros del perfil de textura analizados en cada una de las especies (firmeza, adhesividad, cohesividad, elasticidad, gomosidad y masticabilidad) no presentaron diferencias significativas ($p>0,05$) durante su conservación en hielo (Datos no mostrados). A pesar de que a lo largo del periodo de almacenamiento no se vio una evolución constante de los parámetros de textura en función del tratamiento y de los días de almacenamiento, sí que se observó una leve disminución de todos los parámetros en el último día de análisis con respecto al día 1, quizás debido a la variabilidad de individuos dentro de cada tratamiento estudiado. La firmeza es considerada como uno de los parámetros críticos para la determinación de frescura en pescado, ya que una disminución en sus valores indica el inicio del proceso de descomposición de las fibras del músculo y pérdida de calidad (Jain *et al.*, 2007). Los valores iniciales de firmeza obtenidos en lubina, trucha arcoíris y salmón fueron 61,85 N, 24,42 N y 16,41 N, respectivamente. Estos valores disminuyeron a lo largo del período de conservación en todos los tratamientos, pero las muestras que alcanzaron los resultados más bajos fueron el tratamiento CTRL y H50 llegando a valores finales de 40,7 y 36,57 N en lubina, 17,31 y 15,67 en trucha y 11,89 y 16,02 N en salmón. Los resultados obtenidos en salmón son similares a los reportados por Chan *et al.* (2019) en salmón entero y fileteado, cuyos valores oscilan entre 11 y 15 N durante 23 días de almacenamiento en hielo. Jain *et al.* (2007) mostraron valores de firmeza superiores en pez Rohu tras 8 días de almacenamiento en hielo con respecto a los nuestros. Tras 5 días de conservación observaron una drástica disminución en la firmeza de la piel de este pez, pasando de valores iniciales comprendidos entre 86-96 N a 48-65 N. Aussanasuwannakul *et al.* (2012) analizaron la textura de filetes de trucha arcoíris y observaron una disminución en el parámetro firmeza durante 14 días de conservación a 4 °C. Ayala *et al.* (2010) obtuvieron una disminución en todos los parámetros de textura analizados durante los estados pre y pos mortem en filetes de dorada, presentando diferencias significativas ($p<0,05$) en los parámetros dureza, gomosidad y masticabilidad tras 5 días de almacenamiento. Estos resultados estarían determinados por los cambios bioquímicos que

se producen tras la captura, ya que en las primeras horas se instaura el rigor mortis y en este estado la carne presenta una mayor dureza y mayor gomosidad, lo que hace que la carne resulte muy difícil de masticar (Taylor *et al.*, 2002).

- ***Nitrógeno de trimetilamina (N-TMA)***

En el análisis de este parámetro hemos encontrado que todas las especies estudiadas han presentado diferencias significativas entre tratamientos a lo largo de su período de conservación. En las Tablas 9.2, 9.3 y 9.4 se muestran los valores de N-TMA obtenidos por cada una de las especies bajo los diferentes tratamientos de conservación.

LUBINA (*Dicentrarchus labrax*).

Observamos que los valores iniciales obtenidos en lubinas almacenadas a 2 °C (1,42 mg N/100 g) se mantuvieron muy por debajo de los valores encontrados por otros autores (Cakli *et al.*, 2007 Kilinc *et al.*, 2007) (Tabla 9.2). El tratamiento CTRL mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a los tratamientos con hielo antimicrobiano (50, 75 y 100 mg AEs / kg) obteniendo valores más altos de TMA-N durante todo el período de almacenamiento. Según la FAO (1986) los valores de TMA en pescado fresco están en torno a 1 mg/100 g, mientras que en pescado deteriorado está sobre los 8 mg/100 g. En cambio, otros autores como Dalgaard *et al.* (1993) y Sikorski *et al.* (1989) establecen como límite de aceptabilidad valores máximos comprendidos entre 10-15 mg/100 g y 5-10 mg/100 g, respectivamente.

Si bien, todos los tratamientos presentan valores inferiores al límite máximo establecido en el último día de análisis. TMA-N es un indicador de deterioro del pescado fresco. De hecho, la cantidad de TMA-N de pescado aumenta con el deterioro, por lo tanto, la lubina almacenada con hielo control mostró un mayor deterioro que la lubina conservada con hielo antimicrobiano.

Tabla 9.2. Evolución de N-TMA en lubina conservadas en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50mg AEs/kg (H50), de 75mg AEs/kg (H75) y de 100mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C (n=3±SD).

Especie	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)					
		0	6	13	15	19	21
Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	CTRL	1,42±0,76 ^{Ad}	3,06±0,33 ^{Ac}	3,42±0,33 ^{Ac}	3,73±0,08 ^{Abc}	4,33±0,14 ^{Ab}	5,30±0,72 ^{Aa}
	H50	1,42±0,76 ^{Ac}	1,70±0,29 ^{Bc}	1,68±0,38 ^{Bc}	2,00±0,20 ^{Bbc}	2,88±0,04 ^{BCab}	3,04±0,37 ^{Ca}
	H75	1,42±0,76 ^{Ab}	1,69±0,08 ^{Bb}	1,52±0,12 ^{Bb}	1,75±0,12 ^{Bb}	2,29±0,22 ^{Cab}	2,89±0,31 ^{Ca}
	H100	1,42±0,76 ^{Ac}	1,70±0,56 ^{Bc}	2,02±0,08 ^{Bc}	2,10±0,78 ^{Bc}	3,36±0,53 ^{Bb}	4,39±0,44 ^{Ba}

Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación.

Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*).

En los resultados de N-TMA de trucha conservada con los distintos tipos de hielo (Tabla 9.3), observamos que los valores obtenidos al inicio de la conservación fueron de 0,82 mg/ 100g. Estos valores fueron aumentando conforme aumentaban los días de conservación. Al final del periodo de almacenamiento (día 15) el valor más alto fue obtenido por las muestras conservadas en hielo CTRL (13,23 mg N/100 g), con diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a las truchas conservadas con hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100), que presentaban valores muy por debajo del hielo control (7,08; 6,25 y 5,81 mg N/100 g, respectivamente) destacando que el tratamiento H100 obtuvo los valores más bajos durante todo el período de conservación si lo comparamos con los otros tratamientos con hielo antimicrobiano. Si tenemos en cuenta el límite máximo establecido por la FAO (1986) en el que se considera pescado deteriorado, vemos que el tratamiento CTRL lo excede en el último día de conservación, por lo que las muestras del tratamiento CTRL han presentado una peor conservación que las muestras con hielo antimicrobiano, lo que concuerda con la evaluación sensorial realizada.

Tabla 9.3. Evolución de N-TMA en trucha arcoíris conservada en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50mg AEs/kg (H50), de 75mg AEs/kg (H75) y de 100mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C ($n=3 \pm SD$).

Especie	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)			
		0	6	13	15
Trucha arcoíris	CTRL	0,82 \pm 0,16 ^{Ad}	2,46 \pm 0,33 ^{Bc}	3,83 \pm 1,92 ^{Ab}	13,23 \pm 0,62 ^{Aa}
	H50	0,82 \pm 0,16 ^{Ad}	2,61 \pm 0,96 ^{Ac}	2,49 \pm 0,50 ^{Cb}	7,08 \pm 0,77 ^{Ba}
	H75	0,82 \pm 0,16 ^{Ad}	2,22 \pm 0,56 ^{Cc}	3,45 \pm 1,69 ^{Bb}	6,25 \pm 2,26 ^{Ca}
	H100	0,82 \pm 0,16 ^{Ad}	1,08 \pm 0,25 ^{Dc}	2,01 \pm 0,22 ^{Db}	5,81 \pm 1,95 ^{Da}

Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento.

SALMÓN (*Salmo salar*).

En la Tabla 9.4 observamos que los valores obtenidos en salmón almacenados a 2 °C al inicio de la conservación fueron de 1,42 mg N/ 100 g, estos valores fueron aumentando de manera progresiva a lo largo del período de almacenamiento para todos los tratamientos aplicados. Al final del periodo de almacenamiento los valores presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos, alcanzando las cifras más altas en salmónes conservados en hielo CTRL (11,19 mg N/100 g), mientras que los salmónes

conservados con hielo antimicrobiano H50, H75 y H100 presentaban valores inferiores a este (7,39; 9,98 y 8,02 mg N/100 g). Los tratamientos H50 y H100 son los que mejores resultados muestran al final del período de almacenamiento. Aunque los valores de N-TMA están generados por la acción de los microorganismos alterantes del pescado, la correlación con el número de bacterias presentes no es muy buena (Huss, 1995; Özyurt *et al.*, 2012).

Tabla 9.4. Evolución de N-TMA en salmón conservado en hielo normal (CTRL), hielo antimicrobiano en dosis de 50 mg AEs/kg (H50), de 75 mg AEs/kg (H75) y de 100 mg AEs/kg (H100) en refrigeración a 2 °C (n=3±SD).

Especie	Tratamiento	Tiempo de almacenamiento (días)		
		0	6	13
Salmón	CTRL	1,42±0,06 ^{Ac}	5,71±0,04 ^{ABb}	11,19±0,56 ^{Aa}
	H50	1,42±0,06 ^{Ac}	3,73±0,08 ^{Bb}	7,39±0,08 ^{Ca}
	H75	1,42±0,06 ^{Ac}	4,43±0,64 ^{ABb}	9,98±0,54 ^{ABa}
	H100	1,42±0,06 ^{Ac}	6,17±0,44 ^{Ab}	8,02±0,26 ^{BCa}

Diferentes letras mayúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre tratamientos para el mismo tiempo de conservación. Diferentes letras minúsculas denotan diferencias significativas (p <0,05) entre los tiempos de muestreo para el mismo tratamiento

9.3.3. Evaluación sensorial

La evaluación sensorial de todas las especies estudiadas se realizó utilizando el sistema de la Unidad de Investigación de Alimentos de Tasmania (TRFU) modificado por Cakli *et al.* (2007) y Erikson *et al.* (2019), y desarrollado como método de índice de calidad (QIM). La puntuación QIM total modificada varió de 0 (pescado muy fresco) a 40 (pescado deteriorado). Para cada uno de estos análisis se añaden imágenes del estado del pescado en cada uno de los días de conservación para poder apreciar mejor su evolución.

Los cambios en la apariencia del pescado, sobretudo en ojos y agallas son considerados indicativos para la determinación de la frescura en pescado (Costa *et al.*, 2012; Dowlati *et al.*, 2013).

LUBINA (*Dicentrarchus labrax*).

En cuanto al análisis sensorial (QIM) de las lubinas, inicialmente todos los tratamientos obtuvieron valores característicos de pescado fresco (Figura 9.6). Tras 6 días de conservación los panelistas valoraron mejor las lubinas conservadas con hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) que las almacenadas con hielo CTRL.

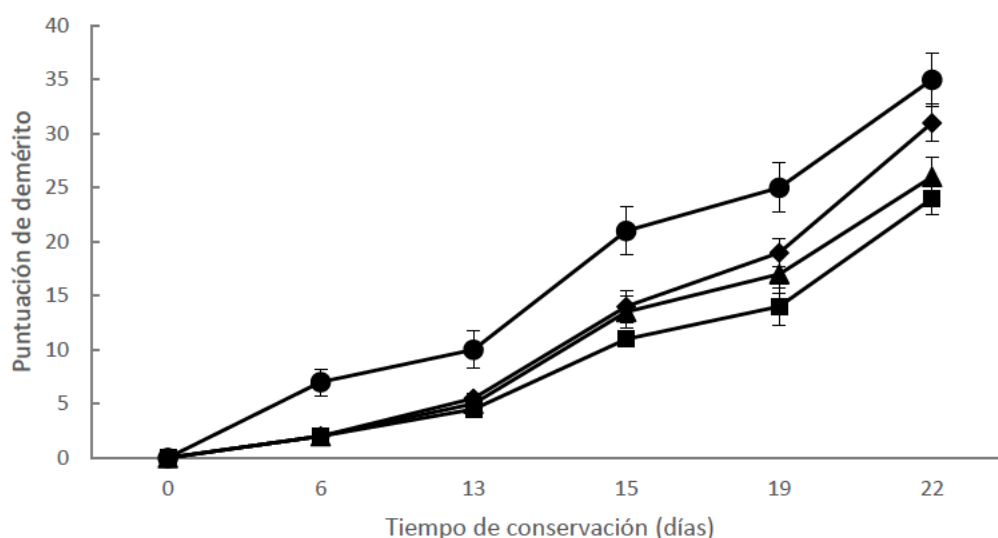


Figura 9.6. QIM, puntuación de lubinas frescas envasadas con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲), H75 (75 mg/kg de β -CD+CBP) (■) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (◆) durante su almacenamiento a 2 °C ($n=3\pm SD$).

Estas puntuaciones se mantuvieron durante todo el período de almacenamiento ya que las lubinas conservadas en hielo antimicrobiano presentaban mejores características generales como: mejor aspecto (apariencia de pescado fresco), mejor olor (ausencia de olor típico de pescado deteriorado), cornea del ojo en buen estado, agallas de color rojizo (sin pardeamiento ni malos olores) y mejor firmeza (Figura 9.7).

Además, cuando se realizó el cocinado de las muestras, no se detectó el sabor ni olor relacionado con los AEs usados durante la conservación. Con lo que podemos concluir que el uso de AEs encapsulado en β -CD es una buena solución para evitar el fuerte olor que desprenden estos aceites.

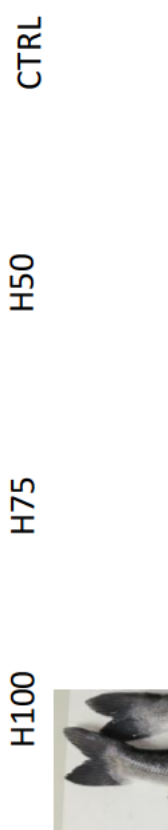


Figura 9.7. Detalles de aspecto general y estado del ojo y agallas de lubinas conservadas en hielo normal (CTRL) y hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) a 2 °C al final del período de conservación (día 22).

TRUCHA (*Oncorhynchus mykiss*).

Los análisis sensoriales realizados en trucha fresca mostraron puntuaciones más bajas en la trucha conservada en hielo normal (CTRL) con respecto a las truchas almacenadas con hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) (Figura 9.8). El aumento en la cantidad de aceite esencial por kg de hielo tuvo un efecto positivo en las puntuaciones de olor y en el estado de los ojos. Las puntuaciones más bajas de la evaluación sensorial se atribuyeron al aroma para las muestras CTRL, seguidas las muestras conservadas en hielo con 50 mg AEs/ kg de hielo. Las muestras mejor valoradas fueron las de los tratamientos H75 y H100 (75 y 100 mg AEs/ kg de hielo). La vida útil para el CTRL se estima en 9 días, mientras que para los tratamientos con hielo antimicrobiano es de 14 días. Valores similares, aunque inferiores de vida útil fueron reportados por Özogul *et al.* (2017) en filetes de trucha arcoiris conservada en hielo, estableciendo 8 días para las muestras no tratadas y 10 para las tratadas con nanoemulsión de AEs.

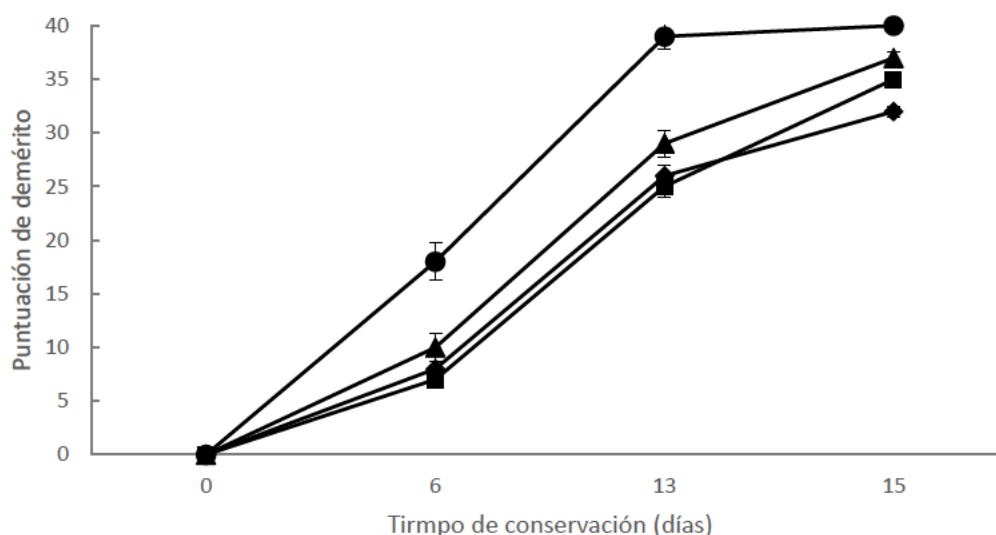


Figura 9.8. QIM, puntuación de truchas arcoíris frescas envasadas con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲), H75 (75 mg/kg de β -CD+CBP) (■) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (◆) durante su almacenamiento a 2 °C ($n=3\pm SD$).

La apariencia es un parámetro importante para evaluar la calidad sensorial de un producto. Como se puede ver en la Figura 9.9, las truchas conservadas con hielo antimicrobiano en dosis de 75 y 100 mg AEs / kg de hielo presentaron una coloración roja-rosada en las agallas y ausencia de moco. Mientras que las muestras del CTRL mostraron el peor color (marrón) en las agallas y la peor apariencia general. Dos Santos *et al.* (2015) reportaron que utilizar las percepciones de los consumidores es una forma efectiva de ayudar a optimizar las condiciones de conservación. En este sentido, las truchas almacenadas con hielo en dosis de 75 y 100 mg AEs / kg mantuvieron su calidad de consumo y apreciación hasta el final del almacenamiento en frío.



Figura 9.9. Detalles de aspecto general y estado del ojo y agallas de truchas arcoíris conservadas en hielo normal (CTRL) y hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) a 2 °C al final del período de conservación (día 15).

SALMÓN (*Salmo salar*).

En el análisis sensorial (QIM) de esta especie, los panelistas encontraron una mejor apariencia general en el salmón almacenado con hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) que en el salmón del hielo control (CTRL) (Figura 9.10).

Además, al final del período de conservación, el olor en las muestras de salmón del tratamiento CTRL se identificó como metálico, mientras que el salmón almacenado con hielo antimicrobiano tenía olor neutro. La Figura 9.11 muestra los detalles de aceptabilidad general como la apariencia y el estado de los ojos y agallas del salmón almacenado a 2 °C al final de su período de conservación (día 13).

El día 13, los panelistas valoraron mejor los salmones almacenados con hielo antimicrobiano, principalmente, en parámetros como olor, estado de los ojos y apariencia general.

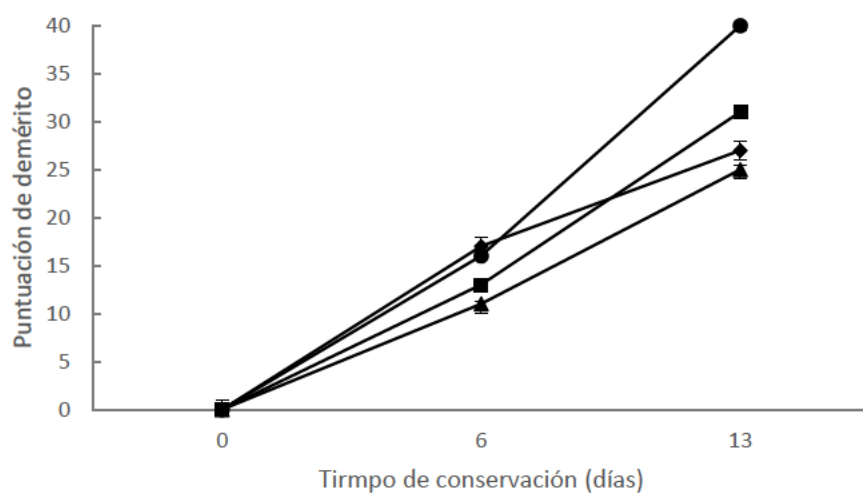


Figura 9.10. QIM, puntuación de salmones frescos envasados con hielo CTRL (●), H50 (50 mg/kg de β -CD+CBP) (▲), H75 (75 mg/kg de β -CD+CBP) (■) y H100 (100 mg/kg de β -CD+CBP) (◆) durante su almacenamiento a 2 °C ($n=3\pm SD$).

CTRL

H50

H75

H100



Figura 9.11. Detalles de aspecto general y estado del ojo y agallas de salmón conservados en hielo normal (CTRL) y hielo antimicrobiano (H50, H75 y H100) a 2 °C al final del período de conservación (día 13).

9.4. Conclusiones

Se han llevado a cabo experimentos con una amplia gama de dosis antimicrobianas, expresadas en mg de aceite esencial encapsulado por kg de hielo, de 50 a 100 mg AEs / kg de hielo. Basándonos en los resultados obtenidos por todos los parámetros analizados, la mejor dosis seleccionada ha sido de 100 mg / kg de hielo para todas las especies de pescado estudiadas. Esta dosis es óptima porque da lugar a una conservación muy interesante que mantiene la frescura y aumenta la vida útil del pescado.

Con la aplicación de esta tecnología de conservación en hielo antimicrobiano de lubina, trucha arcoíris y salmón enteros frescos se consigue extender su vida útil en hasta 6, 5 y 6 días, respectivamente, con respecto a las muestras control.

El coste del aditivo para la fabricación del hielo antimicrobiano por kg de hielo repercute con un aumento mínimo en el coste del pescado (para la venta al consumidor final) de 1-2 céntimos por kg de pescado. Dado que el aumento en el coste del pescado es tan bajo, la proporción de pescado: hielo (3:1) aplicada en este estudio se considera la óptima.

Con respecto a la evaluación sensorial, se valoraron con una mejor puntuación los atributos sensoriales de las especies conservadas en hielo antimicrobiano, independientemente de la dosis aplicada, con respecto a las conservadas en hielo normal (CTRL) durante todo el período de almacenamiento. Diferenciando entre dosis aplicadas en el hielo antimicrobiano, los mejores resultados sensoriales indicando mayor frescura del pescado se han obtenido en la dosis más alta de 100 mg AEs / kg de hielo (H100), lo que indica mejor calidad sensorial reportada por los panelistas a lo largo de la vida útil del pescado fresco.

PARTE IV

Conclusiones y Bibliografía

CAPÍTULO 10

Conclusiones generales

CAPÍTULO 10. Conclusiones generales

Las conclusiones generales obtenidas de todos los estudios realizados en esta Tesis Doctoral son los siguientes:

- ✓ De acuerdo con la Legislación vigente que determina el valor máximo de los parámetros que establecen la calidad físico-química y microbiológica del pescado, y los resultados obtenidos y la discusión de los mismos, se puede establecer que la temperatura de almacenamiento que consigue una mejor conservación de los filetes de pescado de acuicultura es la temperatura de 2 °C.
- ✓ La descontaminación de los filetes previa al envasado reduce la carga microbiológica que prolifera durante el almacenamiento de los mismos, aumentando su vida útil en al menos 7 días. A su vez, reduce el incremento de los valores de pH y N-TMA durante el periodo de almacenamiento, lo que es indicativo de una menor autólisis y degradación, con lo que el deterioro es menor.
- ✓ La aplicación de nuevos sistemas activos antimicrobianos mediante baño en nanoemulsión de aceite esencial de orégano al 0,1% y aplicación de vapor de AEO, junto a una conservación refrigerada de 2 °C, disminuye el crecimiento microbiológico de los filetes con respecto a un envasado tradicional, lo que repercute en una prolongación de la vida útil del producto, que puede llegar hasta los 28 días de almacenamiento manteniendo su calidad de consumo.
- ✓ La conservación de doradas enteras almacenadas con hielo antimicrobiano (β -CD+CBP) tiene un efecto positivo sobre la carga microbiológica durante el periodo de almacenamiento, llegando a reducir 1,5 log UFC/g en microorganismos aerobios mesófilos y 1 ciclo logarítmico en microorganismos psicrófilos. Estos microorganismos son los más abundantes y los que tienen un valor máximo establecido a nivel legislativo como límite de aceptabilidad, por lo que son determinantes para la vida útil del pescado.
- ✓ Los resultados obtenidos para los parámetros físico-químicos evaluados durante el período de conservación de dorada entera en hielo han mostrado valores normales para todas las condiciones estudiadas. Si bien, los valores de pH y N-TMA de las doradas almacenadas en hielo con β -CD+CBP presentaban valores muy por debajo de los encontrados para las doradas almacenadas en hielo control, lo que es indicativo de una mejor conservación del pescado en el hielo antimicrobiano y un menor deterioro, lo que repercute en un aumento de vida útil.

- ✓ El análisis sensorial de dorada entera fresca conservada en hielo antimicrobiano mostró mejores puntuaciones en los atributos sensoriales evaluados a lo largo del período de almacenamiento, lo que determina una mayor calidad, y un aumento de su vida útil de entre 2 y 6 días con respecto al hielo normal.
- ✓ Los AEs encapsulados en β -CD incluidos en el hielo de conservación no repercuten negativamente sobre los atributos sensoriales de las doradas ya que no afectan negativamente al sabor ni olor de las mismas. Además, observamos una mejor apreciación sensorial por parte de los panelistas de las doradas almacenadas con hielo antimicrobiano que fueron cocinadas.
- ✓ El aturrido con aceite esencial de clavo combinado con un almacenamiento de las doradas con hielo encapsulado con β -CD+CBP mejora su conservación, disminuyendo la flora microbiana, evitando el deterioro de las doradas y mejorando la apreciación visual de las mismas y el análisis sensorial, con lo que se aumenta su vida útil hasta en 6 días (incremento del 40% aproximadamente).
- ✓ Los resultados obtenidos por los análisis microbiológicos y físico-químicos, realizados durante la conservación de otras especies como lubina, trucha arcoíris y salmón, en hielo antimicrobiano con β -CD+CBP establecen que la dosis de 100 mg EOs/ kg de hielo es la óptima, ya que mantiene la frescura y aumenta la vida útil del pescado con respecto a la conservación tradicional en hielo del pescado entero.
- ✓ Los atributos sensoriales evaluados que presentaron mejores puntuaciones fueron los de las especies de pescado conservadas en hielo antimicrobiano, lo que indica mejor calidad sensorial reportada por los panelistas a lo largo de la vida útil del pescado fresco.
- ✓ El hielo antimicrobiano como método de conservación es interesante para la industria pesquera ya que el beneficio obtenido sobre la calidad del pescado conservado es mayor y más importante que el incremento en los costes de fabricación del hielo, y su repercusión en el precio de venta del pescado (1-2 céntimos por kg de pescado).
- ✓ Dado que el aumento en el coste del pescado es mínimo, la proporción de pescado: hielo (3:1) aplicada se considera la óptima para la conservación del pescado.

CAPÍTULO 11

Referencias bibliográficas

CAPÍTULO 11. Referencias bibliográficas

- Abarca, R.L., Rodríguez, F.J., Guarda, A., Galotto, M.J. and Bruna, J.E. (2016). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing an essential oil component. *Food Chemistry*. 196: 968-75.
- Ahmad, M., Benjakul, S., Sumpavapol, P. and Nirmal, N.P. (2012). Quality changes of sea bass slices wrapped with gelatin film incorporated with lemongrass essential oil. *International Journal of Food Microbiology*. 155: 171-178.
- Al-Adham, I.S.I., Khalil, E., Al-Hmoud, N.D., Kierans, M. and Collier, P.L. (2000). Microemulsions are membrane-active, antimicrobial, self-preserving systems. *Journal of Applied Microbiology*. 89: 32-39.
- Alasalvar C., Taylor, K.D.A., Öksüz, A., Garthwaite, T., Alexis, M.N. and Grigorakis, K. (2001). Freshness assessment of cultured sea bream (*Sparus aurata*) by chemical, physical and sensory methods. *Food Chemistry*. 72:33–40.
- Alishahi, A. and Aïder, M. (2012). Applications of Chitosan in the seafood industry and aquaculture: A review. *Food and Bioprocess Technology*. 5(3): 817-30.
- Álvarez, A., García García, B., Jordán, M.J., Martínez-Conesa, C. and Hernández, M.D. (2012). The effect of diets supplemented with thyme essential oils and rosemary extract on the deterioration of farmed gilthead seabream (*Sparus Aurata*) during storage on ice. *Food Chemistry*. 132(3): 1395-1405.
- Amos, B. (2007). Analysis of Quality Deterioration At Critical Steps / Points in Fish Handling in Uganda and Iceland and Suggestions for Improvement. 35.
- Ankamah-Yeboah, I., Jacobsen, J.B., Olsen, S.B., Nielsen, M. and Nielsen, R. (2019). The impact of animal welfare and environmental information on the choice of organic fish: an empirical investigation of german trout consumers. *Marine Resource Economics*. 34(3): 248-66.
- AOAC (2019). Official Methods of Analysis. *AOAC International*. 21st edition.
- Appendini, P. and Hotchkiss, J.H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 3: 113-126.
- APROMAR (2018). *La acuicultura en España*. <http://www.apromar.es/si>

tes/default/files/2018/APROMAR_Informe_ACUICULTURA_2018.pdf.

(Consultado 19 Noviembre 2018).

APROMAR (2019). *La Acuicultura En España*. http://www.apromar.es/sites/default/files/2019/APROMAR_Informe_ACUICULTURA_2019.pdf.

(Consultado 28 Enero 2020).

Asbahani, A.E., Miladi, K., Badri, W., Sala, M., Addi, E. H. A., Casabianca, H. and Elaissari, A. (2015). Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 483: 220-243

Ashie, I.N.A., Smith, J.P. and Simpson, B.K. (1996). Spoilage and shelf- life extension of fresh fish and shellfish. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 36(1&2): 87-121.

Atarés, L. and Chiralt, A. (2016). Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends Food Science and Technology*. 48: 51-62.

Atrea, I., Papavergou, A., Amvrosiadis, I. and Savvaidis, I.N. (2009). Combined effect of vacuum-packaging and oregano essential oil on the shelf-life of Mediterranean octopus (*Octopus vulgaris*) from the Aegean Sea stored at 4 °C. *Food microbiology*. 26(2): 166-172.

Attouchi, M. and Sadok, S. (2012). The Effects of essential oils addition on the quality of wild and farmed sea bream (*Sparus aurata*) stored in ice. *Food and Bioprocess Technology*. 5(5): 1803-1816.

Aussanasuwannakul, A., Slider, S.D., Salem, M., Yao, J. and Kenney, P.B. (2012). Comparison of variable-blade to Allo-Kramer shear method in sssessing Rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) fillet firmness. *Journal of Food Science*. 77(9): S335-S341.

Ayala, M.D., Abdel, I., Santaella, M., Martínez, C., Periago, M.J., Gil, F., Blanco, A. and Albors, O.L. (2010). Muscle tissue structural changes and texture development in sea bream (*Sparus aurata* L.), during post-mortem storage. *LWT - Food Science and Technology*. 43:465-475.

- Bahuaud, D., Mørkøre, T., Langsrud, Sinnes, K., Veiseth, E., Ofstad, R. and Thomassen, M.S. (2008). Effects of -1.5 °C Super-chilling on quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) pre-rigor fillets: Cathepsin activity, muscle histology, texture and liquid leakage. *Food Chemistry*. 111: 329-339.
- Bakir, H.M., Hultin, H.O. and Kelleher, S.D. (1994). Gelation properties of fatty fish processed with or without added sodium chloride, cryoprotectants and antioxidants. *Food Research International*. 27(5): 443-49.
- Barnwal, B.K. and Sharma, M.P. (2005). Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 9(4): 363-378.
- Bensid, A., Ucar, Y., Bendeddouche, B. and Özogul, F. (2014). Effect of the icing with thyme, oregano and clove extracts on quality parameters of gutted and beheaded anchovy (*Engraulis encrasicolus*) during chilled storage. *Food Chemistry*. 145: 681-686.
- Boknas, N., Jensen, K.N., Guldager, H.S., Østerberg, C., Nielsen, J. and Dalgaard, P. (2002). Thawed chilled Barents Sea cod fillets in modified atmosphere packaging-application of multivariate data analysis to select key parameters in good manufacturing practice. *LWT - Food Science and Technology*. 35(5): 436-443.
- Bourne, M.C. (1978). Texture profile analysis. *Food Technology*. 32: 62-66.
- Bourne, M.C. (2002). Food texture and viscosity: Concept and measurement (2nd ed.). *New York: Academic Press*.
- Brewer, M.S. (2011). Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10(4): 221-47.
- Buendía-Moreno, L., Ros-Chumillas, M., Navarro-Segura, L., Sánchez-Martínez, M.J., Soto-Jover, S., Antolinos, V., Martínez-Hernández, G.B. and López-Gómez, A. (2019a). Effects of an active cardboard box using encapsulated essential oils on the tomato shelf life. *Food and Bioprocess Technology*. 12(9): 1548-1558.
- Buendía-Moreno, L., Soto-Jover, S., Ros-Chumillas, M., Antolinos, V., Navarro-Segura, L., Sánchez-Martínez, M.J., Martínez-Hernández, G.B. and López-Gómez, A. (2019b). Innovative cardboard active packaging with a coating

- including encapsulated essential oils to extend cherry tomato shelf life. *LWT - Food Science and Technology*. 116: 108584.
- Buendía-Moreno, L., Sánchez-Martínez, M.J., Antolinos, V., Ros-Chumillas, M., Navarro-Segura, L., Soto-Jover, S., Martínez-Hernández, G.B. and López-Gómez, A. (2020). Active cardboard box with a coating including essential oils entrapped within cyclodextrins and/or hallosyte nanotubes. A case study for fresh tomato storage. *Food Control*. 107: 106763.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*. 103(4): 930-936.
- Caballero, M.J., Betancor, M., Escrig, J.C., Montero, D., Espinosa de los Monteros, A., Castro, P., Ginés, R. and Izquierdo, M. (2009). Post mortem changes produced in the muscle of sea bream (*Sparus aurata*) during ice storage. *Aquaculture*. 291: 210-216.
- Caglak, E., Cakli, S. and Kilinc, B. (2008). Microbiological, chemical and sensory assessment of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) stored under modified atmosphere packaging. *European Food Research and Technology*. 226: 1293-1299.
- Cai, L., Cao, A., Li, T., Wu, X., Xu, Y. and Li, J. (2015). Effect of the fumigating with essential oils on the microbiological characteristics and quality changes of refrigerated turbot (*Scophthalmus maximus*) fillets. *Food and Bioprocess Technology*. 8(4): 844-853.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T. and Tolasa, S., (2006). Effects of uncutting on microbiological, chemical and sensory properties of aquacultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *European Food Research and Technology*. 222: 719-726.
- Cakli, S., Kilinc, B., Cadun, A., Dincer, T. and Tolasa, S. (2007). Quality differences of whole ungutted Sea Bream (*Sparus Aurata*) and Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) while stored in ice. *Food Control*. 18(5): 391-97.
- Calo, J.R., Crandall, P.G., O'Bryan, C.A. and Ricke, S.C. (2015). Essential oils as antimicrobials in food systems - A review. *Food Control*. 54: 111-119.

- Campus, M., Bonaglini, E., Cappuccinelli, R., Porcu, M. C., Tonelli, R. and Roggio, T. (2011). Effect of modified atmosphere packaging on Quality Index Method (QIM) scores of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) at low and abused temperatures. *Journal of Food Science*. 76(3): S185-S191.
- Cardenas-Bonilla, A., Sveinsdottir, K. and Martinsdottir, E. (2007). Development of Quality Index Method (QIM) scheme for fresh cod (*Gadus morhua*) fillets and application in shelf life study. *Food Control*. 18: 352-358.
- Carrascosa, C., Millán, R., Saavedra, P., Raduán, Jaber, J., Raposo, A., Pérez, E., Montenegro, T. and Sanjuán, E. (2015). Microbiological evolution of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Canary Islands during ice storage. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 1586-1593.
- Celik, M., Gökçe, M.A., Basusta, N., Küçükgülmez, A., Tasbozan, O. and Tabakoglu, S.S. (2008). Nutritional quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) caught from the atatürk dam lake in turkey. *Journal of Muscle Foods*. 19(1): 50-61.
- Chan, S.S., Roth, B., Skare, M., Hernar, M., Jessen, F., Løvdal, T., Jakobsen, A.N. and Lerfall, J. (2019). Effect of chilling technologies on water holding properties and other quality parameters throughout the whole value chain: from whole fish to cold-smoked fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*. 526: 735381.
- Chang, K.L.B., Chang, J., Shiau, C. and Pan, B.S. (1998). Biochemical, microbiological, and sensory changes of sea bass (*Lateo labrax*). *Society*. 8561(1974): 682-86.
- Cheng, J.H., Sun, D.W., Han, Z. and Zeng, X.A. (2014). Texture and structure measurements and analyses for evaluation of fish and fillet freshness quality: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(1): 52-61.
- Choi, M.J., Soottitantawat, A., Nuchuchua, O., Min, S.G. and Ruktanonchai, U. (2009). Physical and light oxidative properties of eugenol encapsulated by molecular inclusion and emulsion–diffusion method. *Food Research International*. 42: 148-156.
- Chouliara, I., Savvaidis, I.N., Panagiotakis, N. and Kontominas, M.G. (2004). Preservation of salted, vacuum-packaged, refrigerated sea bream (*Sparus aurata*)

- fillets by irradiation: Microbiological, chemical and sensory attributes. *Food Microbiology*. 21: 351-359.
- Chouliara, E., Karatapanis, A., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of oregano essential oil and modified atmosphere packaging on shelf-life extension of fresh chicken breast meat, stored at 4 °C. *Food Microbiology*. 24(6): 607-617.
- Chytiri, S., Chouliara, I., Savvaidis, I. and Kontominas, M. (2004). Microbiological, chemical and sensory assessment of iced whole and filleted aquacultured rainbow trout. *Food Microbiology*. 21: 157-165.
- Chytiri, S., Paleologos, E., Savvaidis, I. and Kontominas, M.G. (2004). Relation of biogenic amines with microbial and sensory changes of whole and filleted freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) stored on ice. *Journal of Food Protection*. 67: 960-965.
- Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3): 113-146.
- Coma, V. (2008). Bioactive packaging technologies for extended shelf life of meat-based products. *Meat Science*, 78(1–2): 90-103.
- Connell, JJ. (1995). *Control of fish quality*. 4th edition.
- Corbo, M.R., Altieri, C., Bevilacqua, A., Campaniello, D., D'Amato, D. and Sinigaglia, M. (2005). Estimating packaging atmosphere-temperature effects on the shelf life of cod fillets. *European Food Research and Technology*. 220: 509-513.
- Corbo, M.R., Speranza, B., Filippone, A., Granatiero, S., Conte, A., Sinigaglia, M. and Del Nobile, M.A. (2008). Study on the synergic effect of natural compounds on the microbial quality decay of packed fish hamburger. *International Journal of Food Microbiology*. 127(3): 261-267.
- Costa, C., Antonucci, F., Menesatti, P., Pallottino, F., Boglione, C. and Cataudella, S. (2012). An advanced colour calibration method for fish freshness 5 assessment: A comparison between standard and passive refrigeration modalities. *Food Bioprocess Technology*. 6: 2190-2195.

- Crini, G. (2014). Review: A history of cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 114(21): 10940-75.
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*. 26(3): 319-333.
- Davis, H.K. (1998). Fish and shellfish. In: Parry RT, editor. Principles and applications of modified atmosphere packaging of foods. Glasgow: *Blakie Academic and Professionals*. 194-239.
- Davies, A.R. (2011). Advances in modified atmosphere packaging. *New Methods of Food Preservation*. 304-320.
- Debevere, J. and Boskou, G. (1996). Effect of modified atmosphere packaging on the tvb/tma-producing microflora of cod fillets. *International Journal of Food Microbiology*. 31: 221-229.
- Dehghani, P., Hosseini, S.M.H., Taghi Golmakani, M., Majdinasab, M. and Esteghlal, S. (2018). Shelf-life extension of refrigerated rainbow trout fillets using total farsi gum-based coatings containing clove and thyme essential oils emulsions. *Food Hydrocolloids*. 77: 677-688.
- Del Nobile, M. A., Corbo, M. R., Speranza, B., Sinigaglia, M., Conte, A. and Caroprese, M. (2009). Combined effect of MAP and active compounds on fresh blue fish burger. *International Journal of Food Microbiology*. 135(3): 281-287.
- Delbarre-Ladrat, C., Chéret, R., Taylor, R. and Verrez-Bagnis, V. (2006). Trends in postmortem aging in fish: Understanding of proteolysis and disorganization of the myofibrillar structure. *Critical Review Food Science and Nutrition*. 46: 409-421.
- Del Valle, E.M.M. (2004). Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochemistry*. 39: 1033-1046.
- Demetzos, C. (2008). Differential Scanning Calorimetry (DSC): A tool to study the thermal behavior of lipid bilayers and liposomal stability. *Journal of Liposome Research*. 18(3): 159-173.
- Dini, I. (2015). Use of essential oils in food packaging. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. 14: 139-147.

- Donsì, F. and Ferrari, G. (2016). Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. *Journal of Biotechnology*, 233: 106-120.
- Dos Santos, B.A., Bastianello Campagnol, P.C., da Cruz, A.G., Galvão, M.T.E.L., Monteiro, R.A., Wagner, R. and Pollonio, M.A.R. (2015). Check all that apply and free listing to describe the sensory characteristics of low sodium dry fermented sausages: Comparison with trained panel. *Food Research International*. 76: 725–34.
- Dowlati, M., Mohtasebi, S.S., Omid, M., Razavi, S.H., Jamzad, M. and de la Guardia, M., (2013). Freshness assessment of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by machine vision based on gill and eye color changes. *Journal of Food Engineering*. 119 (2): 277–287.
- Egolf, P. W. and Kauffeld, M. (2005). From physical properties of ice slurries to industrial ice slurry applications. *International Journal of Refrigeration*. 28(1): 4-12.
- Erikson, U., Truong, H.T.M., Le, D.V., Pham, P.D., Svennevig, N. and Phan, V.T. (2019). Harvesting procedures, welfare and shelf life of ungutted and gutted shortfin pompano (*Trachinotus falcatus*) stored in ice. *Aquaculture*. 498: 236-245.
- Erkan, N. (2010). The Effect of thyme and garlic oil on the preservation of vacuum-packaged hot smoked Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food and Bioprocess Technology*. 5(4): 1246-1254.
- Erkan, N. and Bilen, G. (2010). Effect of essential oils treatment on the frozen storage stability of chub mackerel fillets. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*. 5(1): 101-110.
- Erkan, N., Tosun, S.Y., Ulusoy, S. and Üretener, G. (2011). The use of thyme and laurel essential oil treatments to extend the shelf life of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) during storage in ice. *Journal Für Verbraucherschutz Und Lebensmittelsicherheit*. 6(1):39-48.
- European Commission (2009). Commission Regulation (EC) No. 450/2009 of 29 May 2009 on active and intelligent materials and articles intended to come into contact with food. *Official Journal of European Union* (450):L 135: 3-11.
- European Medicines Agency. (2017). Cyclodextrins Used as Excipients.

- 44(EMA/CHMP/333892/2013):1–16.
- Eymard, S., Baron, C.P. and Jacobsen, C. (2009). Oxidation of lipid and protein in Horse Mackerel (*Trachurus Trachurus*) mince and washed minces during processing and storage. *Food Chemistry*. 114: 57-65.
- Fagan, J.D., Gormley, T.R. and Uí Mhuirheartaigh, M.M. (2004). Effect of modified atmosphere packaging with freeze-chilling on some quality parameters of raw whiting, mackerel and salmon portions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 5: 205-214.
- Fang, Z., Zhao, Y., Warner, R.D. and Johnson, S.K. (2017). Active and intelligent packaging in meat industry. *Trends in Food Science and Technology*. 61: 60-71.
- FAO (1986) Food and Agriculture Organization of the United Nations: Manuals of Food Quality Control. Rome. 14/8: 139-142.
- FAO. (2013). Species Profile: Atlantic Salmon (*Salmo Salar* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Feed and Fertilizer Resources Information System*. 1-14.
- FAO. (2018a). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Consultado 13 enero 2020 en [http://www.fao.org/estado de acuicultura](http://www.fao.org/estado-de-acuicultura).
- FAO. (2018b). The State of Fisheries and Aquaculture in the world. Consultado 15 enero 2020 en <http://www.fao.org/state-of-fisheries-aquaculture>.
- Fenyvesi, E., Vikmon, M.A. and Szente, L. (2016). Cyclodextrins in food technology and human nutrition: benefits and limitations. *Critical Review Food Science and Nutrition*. 56(12): 1981-2004.
- Ferguson, J.W., Sandford, B.J., Reagan, R.E., Gilbreath, L.G., Meyer, E.B., Ledgerwood R.D. and Adams, N.S. (2007). Bypass system modification at Bonneville Dam on the Columbia River improved the survival of juvenile salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*. 136(6): 1487-1510.
- Fletcher, G.C. (2012). Advances in vacuum and modified atmosphere packaging of fish and crustaceans. *Advances in Meat, Poultry and Seafood Packaging*. 261-297. Woodhead Publishing Limited.
- Foegeding, E.A. and Lanier, T.C. (1996). Characteristic of edible muscle tissues. *Food*

- Chemistry*. 879-942, 3rd ed. O. R. Fennema, ed. Marcel Dekker, New York.
- Frangos, L., Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N. (2010). Combined effects of salting, oregano oil and vacuum-packaging on the shelf-life of refrigerated trout fillets. *Food Microbiology*. 27(1): 115–121.
- García, A.J., Esteban, M.B., Márquez, M.C. and Ramos, P. (2005). Biodegradable municipal solid waste: Characterization and potential use as animal feedstuffs. *Waste Management*. 25: 780-787.
- Garcia De Leaniz, C., Fleming, I. A., Einum, S. Verspoor, E., Jordan, W. C., Consuegra, S., Aubin-Horth, N., Lajus, D., Letcher, B.H., Youngson, A.F., Webb, J.H., Vøllestad, L.A., Villanueva, B., Ferguson, A. and Quinn, T.P. (2007). A critical review of adaptive genetic variation in Atlantic Salmon: Implications for conservation. *Biological Reviews*. 82(2): 173-11.
- Garrido, M.D., Hernández, M.D., Espinosa, M.C. and López, M.B. (2016). Enhanced quality characteristics of refrigerated seabream (*Sparus aurata*) fillets packed under different systems (modified atmosphere vs. vacuum). *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 25(2): 156-168.
- Gennari, M., Tomaselli, S. and Cotrona, V. (1999). The microflora of fresh and spoiled sardine (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice. *Food Microbiology*. 16: 15-28.
- Ghaly, A.E., Dave, D., Budge, S. and Brooks, M.S. (2010). Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: Review department of process engineering and applied science, Dalhousie University Halifax, Nova Scotia, Canada. *American Journal of Applied Sciences*. 7(7): 859-877.
- Ghanbari, M., Jami, M., Domig, K.J. and Kneifel, W. (2013). Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *LWT - Food Science and Technology*. 54(2): 315-24.
- Ghani Kuvei, F., Khodanazary, A. and Zamani, I. (2019). Quality index method (QIM) sensory scheme for gutted greenback grey mullet *Chelon subviridis* and its shelf life determination. *International Journal of Food Properties*. 22 (1): 618-629.
- Ghosh, V., Mukherjee, A. and Chandrasekaran, N. (2013). Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity.

- Ultrasonics Sonochemistry*. 20(1): 338-344.
- Giarratana, F., Muscolino, D., Beninati, C., Ziino, G., Giuffrida, A. and Panebianco, A. (2016). Activity of R(+) limonene on the maximum growth rate of fish spoilage organisms and related effects on shelf-life prolongation of fresh gilthead sea bream fillets. *International Journal of Food Microbiology*. 237: 109-113.
- Gokoglu, N. and Yerlikaya, P. (2015). Seafood chilling, refrigeration and freezing: science and technology. *Chichester, UK: Wiley Blackwell*. 225.
- Gokoglu, N. (2018). Novel natural food preservatives and applications in seafood preservation: a review. *Journal Science of Food and Agriculture*. 99(5): 2068-2077.
- Gómez-Estaca, J., López de Lacey, A., López-Caballero, M.E., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2010). Biodegradable gelatin-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiology*. 27(7): 889–896.
- Goulas, A.E., and Kontominas, M.G. (2005). Effect of salting and smoking-method on the keeping quality of chub mackerel (*Scomber japonicus*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*. 93(3): 511-520.
- Goulas, A.E. and Kontominas, M.G. (2007). Combined effect of light salting, modified atmosphere packaging and oregano essential oil on the shelf-life of sea bream (*Sparus Aurata*): Biochemical and sensory attributes. *Food Chemistry*. 100(1): 287-96.
- Gram, L. and Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*. 33(1): 121-137.
- Grau, R. and Hamm, R. (1953). A simple method for the determination of water binding in muscles. *Naturwissenschaften*. 40: 1-29.
- Gregersen, F. (2001). Storage in ice water increases weight. *Fiskeriforskning. Info Norwegian Institute of Fisheries and Aquaculture Ltd*. 1:1.
- Grigorakis, K.M., Alexis, K.D., Taylor, A. and Hole, M. (2002). Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus Aurata*); Composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology*. 37(5): 477-84.

- Grigorakis, K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*. 272: 55-75.
- Hamm, R. (1972). *Kolloidchemie des Fleisches*. Berlin, Hamburg: Paul Parey Verlag. 222.
- Han, J.H. (2013). A review of food packaging technologies and innovations. *Innovations in Food Packaging: Second Edition*. 3-12.
- Hassoun, A. and Emir Çoban, Ö. (2017). Essential oils for antimicrobial and antioxidant applications in fish and other seafood products. *Trends in Food Science and Technology*. 68: 26-36.
- Hernández, M.D., López, M.B., Álvarez, A., Ferrandini, E., García García, B. and Garrido, M.D. (2009). Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured Meagre (*Argyrosomus Regius*) fillets during ice storage. *Food Chemistry*. 114(1): 237-45.
- Holley, R.A. and Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 22: 273-292.
- Huidobro, A., Pastor, A. and Tejada, M. (2000). Quality index method developed for raw gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Food Science*. 65: 1202-1205.
- Huss, H.H., Embarek, P.K.B. and Jeppesen, V.F. (1995). Control of biological hazards in cold smoked salmon production. *Food Control*. 6: 335-340.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), (1986). Sampling plans for fish and shellfish. *ICMSF, Microorganisms in Foods. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Scientific Applications*. 181-196.
- Ipohorski, M. and Bozzano, P.B. (2013). Microscopía Electrónica de Barrido (SEM): en la Caracterización de Materiales. *Ciencia e Investigacion*. 63(3): 43-53.
- İzci, L., Ekici, F. and Günlü, A. (2018). Coating with chitosan film of sea bream (*sparus aurata*) fillets: determining shelf life in refrigerator conditions. *Food Science and Technology*. 38(1): 54-59.

- Jääskeläinen, E., Jakobsen, L.M.A., Hultman, J., Eggers, N., Bertram, H.C., and Björkroth, J. (2019). Metabolomics and bacterial diversity of packaged yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and salmon (*Salmo salar*) show fish species-specific spoilage development during chilled storage. *International Journal of Food Microbiology*. 293: 44-52.
- Jayasena, D.D. and Jo, C. (2013). Essential oils as potential antimicrobial agents in meat and meat products: A review. *Trends in Food Science and Technology*. 34: 96-108.
- Kaale, L.D., Eikevik, T.M., Bardal, T. and Kjorsvik, E. (2013). A study of the ice crystals in vacuum-packed salmon fillets (*Salmon salar*) during superchilling process and following storage. *Journal of Food Engineering*. 115: 20-25.
- Kamimura, J.A., Santos, E.H., Hill, L.E. and Gomes, C.L. (2014). Antimicrobial and antioxidant activities of carvacrol microencapsulated in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *LWT - Food Science and Technology*. 57(2): 701-709.
- Kerry, J.P., O'Grady, M.N. and Hogan, S.A. (2006). Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. *Meat Science*. 75: 113-130.
- Khoshnoudi-Nia, S. and Moosavi-Nasab, M. (2019). Prediction of various freshness indicators in fish fillets by one multispectral imaging system. *Scientific reports*. 9, 1-11.
- Kilinc, B., Cakli, S., Cadun, A., Dincer T. and Tolasa, S. (2007). Comparison of effects of lurry ice and flake ice pretreatments on the quality of aquacultured sea bream (*Sparus Aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus Labrax*) stored at 4 °C. *Food Chemistry*. 104(4): 1611-17.
- Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I.N. and Kontominas, M.G. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*. 26(5): 475-482.
- Kriton, G., Dimitra, K., Corraze, G., Jaume, P.S., Adorjan, A. and Zsuzsanna, J.S., (2018). Impact of diets containing plant raw materials as fish meal and fish oil replacement on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gilthead seabream (*Sparus aurata*), and common carp (*Cyprinus carpio*) freshness. *Journal of Food Quality*. 1717465: 14.

- Kyrana, V.R. and Lougovois, V.P. (2002). Sensory, chemical and microbiological assessment of farm-raised European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in melting ice. *International Journal of Food Science and Technology*. 37: 319-328.
- Lakshmanan, R., Jeya Shakila, R. and Jeyasekaran, G. (2002). Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiology*. 19(6): 617-625.
- Lee, G., Kim, Y., Kim, H., Beuchat, L.R. and Ryu, J.H. (2018). Antimicrobial activities of gaseous essential oils against *Listeria monocytogenes* on a laboratory medium and radish sprouts. *International Journal of Food Microbiology*. 265: 49-54.
- Lepetit, J. (2007). A theoretical approach of the relationships between collagen content, collagen cross-links and meat tenderness. *Meat Science*. 76(1): 147-59.
- Lerfall, J., Roth, B., Skare, E.F., Henriksen, A., Betten, T., Dziatkowiak-Stefaniak, M.A. and Rotabakk, B.T. (2015). Pre-mortem stress and the subsequent effect on flesh quality of pre-rigor filleted Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during ice storage. *Food Chemistry*. 175: 157-165.
- Leroi, F., Joffraud, J.J. and Chevalier, F. (2000). Effect of salt and smoke on the microbiological quality of cold-smoked salmon during storage at 5°C as estimated by the factorial design method. *Journal of Food Protection*. 63: 502-508.
- Li-Tsang C.W., Lau J.C. and Liu S.K. (2003). Validation of an objective scar pigmentation measurement by using a spectrophotometer. *Burns*. 29(8): 779-84.
- López-Cánovas, A.E., Cabas, I., Ros-Chumillas, M., Navarro-Segura, L., López-Gómez, A. and García-Ayala, A. (2019). Nanoencapsulated clove essential oil applied in low dose decreases stress in farmed gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) during slaughter by hypothermia in ice slurry. *Aquaculture*. 504: 437-446.
- López-Gómez, A., Cerdán-Cartagena, F., Suardiáz-Muro, J., Boluda-Aguilar, M., Hernández-Hernández, M.E., López-Serrano M.A. and López-Coronado, J. (2014). Radiofrequency identification and surface acoustic wave technologies for developing the food intelligent packaging concept. *Food Engineering Reviews* 7(1):11-32.

- López-Gómez A and López-Cánovas D. (2016). Method for the surface decontamination of packaged solid food.
- López-Gómez, A, Ros-Chumillas, M., Antolinos, V., Buendía-Moreno, L., Navarro-Segura, L., Sánchez-Martínez, M.J., Martínez-Hernández, G.B. and Soto-Jover. (2019). Fresh culinary herbs decontamination with essential oil vapours applied under vacuum conditions. *Postharvest Biology and Technology*. 156: 110942.
- MAPA (2020a). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. DORADA (*Sparus Aurata*). Consultado 10 febrero 2020.
- MAPA (2020b). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Lubina (*Dicentrarchus Labrax*). Vol. 9. Consultado 10 febrero 2020.
- MAPA (2020c). Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Trucha Arco Iris (*Oncorhynchus Mykiss*). Consultado 10 febrero 2020.
- MAPAMA (2015). Ministerio de agricultura alimentación y Medio Ambiente. Informe Salmón (*Salmo Salar*). Consultado 19 febrero 2020.
- Maqsood, S., Benjakul, S., Abushelaibi, A. and Alam, A. (2014). Phenolic compounds and plant phenolic extracts as natural antioxidants in prevention of lipid oxidation in seafood: a detailed review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 13(6): 1125-1140.
- Marques, H.M.C. (2010). A review on cyclodextrin encapsulation of essential oils and volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. 25(5): 313-326.
- Martinsdottir, E., Luten, J., Schelvis, R. and Hyldig, G. (2003). Scientific developments of QIM: past and future. J. B. Luten, J. Oehlenschlager, & G. Olafsdottir (Eds.), *Quality of fish from catch to consumer: Labelling, monitoring and traceability*. 265-272. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Masniyom, P., Benjakul, S. and Visessanguan, W. (2002). Shelf-life extension of refrigerated seabass slices under modified atmosphere packaging. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82(8): 873-880.
- Masniyom, P., Benjakul, S. and Visessanguan, W. (2005). Combination effect of phosphate and modified atmosphere on quality and shelf-life extension of refrigerated seabass slices. *LWT - Food Science and Technology*. 38: 745-756.

- Mastromatteo, M., Conte, A. and Del Nobile, M.A. (2010). Combined use of modified atmosphere packaging and natural compounds for food preservation. *Food Engineering. Reviews*. 2: 28-38.
- Maté, J., Periago, P.M. and Palop, A. (2016). When nanoemulsified, d-limonene reduces *Listeria monocytogenes* heat resistance about one hundred times. *Food Control*. 59: 824-828.
- Maté, J., Periago, P.M., Ros-Chumillas, M., Grullón, C., Huertas, J.P. and Palop, A. (2017). Fat and fibre interfere with the dramatic effect that nanoemulsified d-limonene has on the heat resistance of *Listeria Monocytogenes*. *Food Microbiology*. 62: 270-74.
- Mazorra-Manzano, M.A., Pacheco-Aguilar, R., Diaz-Rojas, E.I. and Lugo-Sanchez, M.E. (2000). Postmortem changes in black skipjack muscle during storage in ice. *Journal of Food Science*. 65(5): 774-779.
- Medina, I., Gallardo, J.M. and Aubourg, S.P. (2009). Quality preservation in chilled and frozen fish products by employment of slurry ice and natural antioxidants. *International Journal of Food Science and Technology*. 44(8): 1467-1479.
- Mejlholm, O. and Dalgaard, P. (2002). Antimicrobial effect of essential oils on the seafood spoilage micro-organism *Photobacterium phosphoreum* in liquid media and fish products. *Letters in Applied Microbiology*. 34(1): 27-31.
- Mendes, R. and Gonçalves, A. (2008). Effect of soluble CO₂ stabilisation and vacuum packaging in the shelf life of farmed sea bream and sea bass fillets. *Journal of Food Science and Technology*. 43: 1678-1687.
- Mendes, R. (2019). Technological processing of fresh gilthead seabream (*Sparus aurata*): A review of quality changes. *Food Reviews International*. 35(1): 20-53.
- Menezes, P.P., Serafini, M.R., Barbosa Gomes de Carvalho, Y.M., Soares Santana, D.V., Santos Lima, B., Quintans-Júnior, L.J., Neves Marreto, R., Mendoça de Aquino, T., Rodrigues Sabino, A., Scotti, L., Scotti, M.T., Grangeiro-Júnior, S. and de Souza Araújo, A.A. (2016). Kinetic and physical-chemical study of the inclusion complex of β -cyclodextrin containing carvacrol. *Journal of Molecular Structure*. 1125: 323-330.

- Messina, C.M., Bono, G., Renda, G., La Barbera, L. and Santulli, A. (2015). Effect of natural antioxidants and modified atmosphere packaging in preventing lipid oxidation and increasing the shelf-life of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 62: 271-277.
- Mikš-Krajnik, M., Yoon, Y.J., Ukuku, D.O. and Yuk, H.G. (2016). Volatile chemical spoilage indexes of raw Atlantic salmon (*Salmo salar*) stored under aerobic condition in relation to microbiological and sensory shelf lives. *Food Microbiology*. 53: 182-191.
- Mol, S., Erkan, N., Üçok, D. and Tosun, Ş.Y. (2007). Effect of psychrophilic bacteria to estimate fish quality. *Journal of Muscle and Foods*. 18: 120-128.
- Nagarajarao, R.C. (2016). Recent advances in processing and packaging of fishery products: A review. *Aquatic Procedia*, 7: 201-213.
- Navarro-Segura, L., Ros-Chumillas, M., López-Cánovas, A.E., García-Ayala, A. and López-Gómez, A. (2019). Nanoencapsulated essential oils embedded in ice improve the quality and shelf life of fresh whole seabream stored on ice. *Heliyon*. 5: e01804.
- Ocaño-Higuera, V.M., Marquez-Ríos, E., Canizales-Dávila, M., Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M.E. and Graciano-Verdugo, A.Z. (2009). Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chemistry*. 116(4): 933-938.
- Ocaño-Higuera, V.M., Maeda-Martínez, A.N., Marquez-Ríos, E., Canizales-Rodríguez, D.F., Castillo-Yáñez, F.J., Ruíz-Bustos, E. and Plascencia-Jatomea, M. (2011). Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chemistry*. 125(1): 49-54.
- Ofstad, R., Kidman, S., Myklebust, R., Olsen, R.L. and Hermansson, A.M. (1995). Liquid-holding capacity and structural changes in comminuted salmon (*Salmo salar*) muscle as influenced by pH, salt and temperature. *LWT - Food Science and Technology*. 28: 329-339.
- Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H. (2010). Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*. 120: 193-198.

- Ólafsdóttir, G., Martinsdóttir, E., Oehlenschläger, J., Dalgaard, P., Jensen, B., Undeland, I., Mackie, I.M., Henahan, G., Nielsen, J. and Nilsen, H. (1997). Methods to evaluate fish freshness in research and industry. *Trends in Food Science and Technology*. 8(8): 258-265.
- Olatunde, O.O., Benjakul, S. and Vongkamjan, K. (2019). Comparative study on nitrogen and argon-based modified atmosphere packaging on microbiological, chemical, and sensory attributes as well as on microbial diversity of Asian sea bass. *Food Packaging Shelf Life*. 22: 100404.
- Olsson, G.B., Olsen, R.L. and Ofstad, R. (2003a). Post-mortem structural characteristics and water-holding capacity in atlantic halibut muscle. *LWT - Food Science and Technology*. 36(1): 125-33.
- Olsson, G.B., Olsen, R.L., Carlehög, M. and Ofstad, R. (2003b). Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild atlantic halibut (*Hippoglossus Hippoglossus*). *Aquaculture*. 217(1-4): 191-205.
- O'Sullivan, M.G. (2016). Packaging technologies for maintaining sensory quality. A *Handbook for Sensory and Consumer-Driven New Product Development*. 125-149.
- Özogul, F., Polat, A. and Özogul, Y. (2004). The effects of modified atmosphere packaging and vacuum packaging on chemical, sensory and microbiological changes of sardines (*Sardina pilchardus*). *Food Chemistry*. 85(1): 49-57.
- Özogul, İ., Polat, A., Özogul, Y., Boga, E.K., Özogul, F. and Ayas, D. (2014). Effects of laurel and myrtle extracts on the sensory, chemical and microbiological properties of vacuumpacked and refrigerated European eel (*Anguilla anguilla*) fillets. *International Journal of Food Science and Technology*. 49: 847-853.
- Özogul, Y., Durmus, M., Ucar, Y., Özogul, F. and Regenstein, J.M., (2016). Comparative study of nanoemulsions based on commercial oils (sunflower, canola, corn, olive, soybean, and hazelnut oils): effect on microbial, sensory, and chemical qualities of refrigerated farmed sea bass. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 33: 422-430.
- Ozogul, Y., Yuvka, I., Ucar, Y., Durmus, M., Kösker, A.R., Öz, M. and Ozogul, F.

- (2017). Evaluation of effects of nanoemulsion based on herb essential oils (rosemary, laurel, thyme and sage) on sensory, chemical and microbiological quality of rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) fillets during ice storage. *LWT - Food Science and Technology*. 75: 677-84.
- Özyurt, G., Kuley, E., Balikçi, E., Kaçar, C., Gökdogan, S., Etyemez, M. and Özogul, F. (2012). Effect of the icing with rosemary extract on the oxidative stability and biogenic amine formation in sardine (*Sardinella Aurita*) during chilled storage. *Food and Bioprocess Technology*. 5(7): 2777-2786.
- Parlapani, F.F., Mallouchos, A., Haroutounian, S.A. and Boziaris, I.S. (2014). Microbiological spoilage and investigation of volatile profile during storage of sea bream fillets under various conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 189: 153-163.
- Parlapani, F.F., Kormas, K.A. and Boziaris, I.S. (2015). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95(12): 2386-2394.
- Parlapani, F.F., Verdos, G.I., Haroutounian, S.A. and Boziaris, I.S. (2015). The dynamics of *Pseudomonas* and volatilome during the spoilage of gutted sea bream stored at 2 °C. *Food Control*. 55: 257-265.
- Pastoriza, L., Sampedro, G., Herrera, J.J. and Cabo, M.L. (1998). Influence of sodium chloride and modified atmosphere packaging on microbiological, chemical and sensorial properties of aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice. *Food Microbiology*. 20: 411-420.
- Pastoriza, L., Bernárdez, M., Sampedro, G., Cabo, M.L. and Herrera, J.J.R. (2004). Elevated concentrations of oxygen on the stability of live mussel stored refrigerated. *European Food Research and Technology*. 218(5): 415-419.
- Patel, S. (2015). Plant essential oils and allied volatile fractions as multifunctional additives in meat and fish-based food products: A review. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*. 32(7): 1049-64.

- Peretto, G., Du, W.X., Avena-Bustillos, R.J., Sarreal, S.B.L., Hua, S.S.T., Sambo, P. and McHugh, T.H. (2014). Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology*. 89: 11-18.
- Perricone, M., Arace, E., Corbo, M. R., Sinigaglia, M. and Bevilacqua, A. (2015). Bioactivity of essential oils: a review on their interaction with food components. *Frontiers in Microbiology*. 6: 76.
- Pezeshk, S., Ojagh, S.M. and Alishahi, A. (2015). Effect of plant antioxidant and antimicrobial compounds on the shelf-life of seafood - A review. *Czech Journal of Food Sciences*. 33(3): 195-203.
- Piqué, T.M. and Vázquez, A. (2012). Uso de espectroscopía infrarroja con transformada de fourier (ftir) en el estudio de la hidratación del cemento. *Concreto y Cemento. Investigación y Desarrollo*. 3(2): 62-71.
- Piletti, R., Bugiereck, A.M., Pereira, A.T., Gussati, E., Dal Magro, J., Mello, J.M.M., Dalcanton, F., Ternus, R.Z., Soares, C., Riella, H.G. and Fiori, M.A. (2017). Microencapsulation of eugenol molecules by β -cyclodextrine as a thermal protection method of antibacterial action. *Material Sciences and Engineering*. 75: 259-271.
- Ponce-Cevallos, P.A., Buera, M.P. and Elizalde, B.E. (2010). Encapsulation of cinnamon and thyme essential oils components (Cinnamaldehyde and Thymol) in β -Cyclodextrin: effect of interactions with water on complex stability. *Journal of Food Engineering*. 99(1): 70-75.
- Prabu, S., Swaminathan, M., Sivakumar, K. and Rajamohan, R., (2015). Preparation, characterization and molecular modelling studies of the inclusion complex of caffeine with beta-cyclodextrin. *Journal of Molecular Structure*. 1099: 616-624.
- Provincial, L., Gil, M., Guillén, E., Alonso, V., Roncalés, P. and Beltrán, J.A. (2010). Effect of modified atmosphere packaging using different CO₂ and N₂ combinations on physical, chemical, microbiological and sensory changes of fresh sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *International Journal of Food Science and Technology*. 45(9): 1828-1836.

- Pyrgotou, N., Giatrakou, V., Ntzimani, A. and Savvaidis, I.N. (2010). Quality assessment of salted, modified atmosphere packaged rainbow trout under treatment with oregano essential oil. *Journal of Food Science*. 75(7): 406-411.
- Ramos, M., Beltrán, A., Peltzer, M., Valente, A.J.M. and Garrigós, M.C. (2014). Release and antioxidant activity of carvacrol and thymol from polypropylene active packaging films. *LWT - Food Science and Technology*. 58(2): 470-477.
- Ravindran, R. and Jaiswal, A.K. (2016). Exploitation of food industry waste for high-value products. *Trends in Biotechnology*. 34(1): 58-69. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.008>.
- Reyes-Jurado, F., Palou, E. and López-Malo, A. (2012). Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*. 6-1: 29-39.
- Robertson, G.L. (1993). Deteriorative reactions in foods. In G.L. Robertson (Ed). *Food packaging. Principles and practice*. New York: Marcel Dekker. 252-303.
- Robertson, G. L. (2010). Food packaging and shelf life. In G.L. Robertson (Ed.). *Food packaging and shelf life. A practical guide* (1-16). CRC Press.
- Rodrigues, B.L., Alvares, T.S., Lopes Sampaio, G.S., Cabral, C.C, Arcanjo Araujo, J.V., Maia Franco, M., Borges Mano, S. and Conte Junior, C.A. (2016). Influence of vacuum and modified atmosphere packaging in combination with UV-C radiation on the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *Food Control*. 60: 596-605.
- Rodríguez, O., Torres, M., Piñeiro, C., Losada, V., Aubourg, S.P. and Barros-Velázquez, J. (2003). Extensión of shelf life and microbial activity of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) stored in flow ice. *Novas perspectivas sobre conservação, processamento e qualidade de alimentos*. Actas do 68 encontro de química de alimentos, June 2003, Lisboa, Portugal. I:58-66.
- Rodriguez-Garcia, I., Silva-Espinoza, B.A., Ortega-Ramirez, L.A., Leyva, J.M., Siddiqui, M.W., Cruz-Valenzuela, M.R. and Ayala-Zavala, J.F., (2016). Oregano essential oil as an antimicrobial and antioxidant additive in food products. *Critical Review. Food Science Nature*. 56 (10): 1717-1727.

- Rohman, A. and Che Man, Y.B. (2011). Analysis of chicken fat as adulterant in cod liver oil using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and chemometrics. *CYTA - Journal of Food*. 9(3): 187-191.
- Ros-Chumillas, M., Garre, A., Maté, J., Palop, A. and Periago, P.M. (2017). Nanoemulsified D-Limonene reduces the heat resistance of salmonella senftenberg over 50 times. *Nanomaterials*. 7(3): 1-8.
- Ruiz-Capillas, C., Gillyon, C.M. and Horner, W.F.A. (2000). Determination of volatile basic nitrogen and trimethylamine nitrogen in fish sauce by flow injection analysis. *European Food Research and Technology*. 210: 434-436.
- Ruiz-Capillas, C. and Moral, A. (2001). Residual effect of CO₂ on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. *European Food Research and Technology*. 212(4): 413-420.
- Sacks, B. and Gore, A. (1987). Gas packaging – techniques and trends. *Food Reviews*. 14: 26-39.
- Salvia-Trujillo, L., Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. and Martín-Belloso, O. (2015). Use of antimicrobial nanoemulsions as edible coatings: Impact on safety and quality attributes of fresh-cut fuji apples. *Postharvest Biology and Technology*. 105: 8-16.
- Santaella Pascual, M. (2011). Nuevas presentaciones comerciales de dorada (*Sparus aurata* L.) de acuicultura. evaluación de la calidad y seguridad alimentaria. *Universidad de Murcia*, Murcia, España. <http://hdl.handle.net/10201/34633>.
- Sant'Ana, L.S., Soares, S. and Vaz-Pires, P. (2011). Development of a quality index method (QIM) sensory scheme and study of shelf-life of ice-stored blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*). *LWT - Food Science and Technology*. 44: 2253-2259.
- Santos, E.H., Kamikura, J.A., Hill, L.E. and Gomes, C.L., (2015). Characterization of carvacrol beta-cyclodextrin inclusion complexes as delivery systems for antibacterial and antioxidant applications. *LTW Food Science and Technology*. 60: 583-592.
- Schubring, R. (2002). Influence of freezing/thawing and frozen storage on the texture and colour of brown shrimp (*Crangon crangon*). *Archiv Für Lebensmittel Hygiene*.

53(2): 34-36.

- Secci, G. and Parisi, G. (2016). From farm to fork: Lipid oxidation in fish products. A review. *Italian Journal of Animal Science*. 15(1): 124-136.
- Seo, S.M., Jung, C.S., Kang, J., Lee, H.R., Kim, S.W., Hyun, J. and Park, I.K. (2015). Larvicidal and acetylcholinesterase inhibitory activities of apiaceae plant essential oils and their constituents against aedes albopictus and formulation development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 63: 9977-9986.
- Shadman, S., Hosseini, S.E., Langroudi, H.E. and Shabani, S. (2017). Evaluation of the effect of a sunflower oil-based nanoemulsion with Zataria multiflora Boiss. essential oil on the physicochemical properties of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during cold storage. *LWT - Food Science and Technology*. 79: 511-517.
- Sharifian, S., Zakipour, E., Mortazavi, M.S. and Arshadi, A. (2011). Quality assessment of tiger tooth croaker (*Otolithes ruber*) during ice storage. *International Journal of Food Properties*. 14: 309-318.
- Sharifian, S., Alizadeh, E., Mortazavi, M. S. and Shahriari Moghadam, M. (2014). Effects of refrigerated storage on the microstructure and quality of Grouper (*Epinephelus coioides*) fillets. *Journal of Food Science and Technology*. 51(5): 929-935.
- Sikorski, Z.E, Kolakowska, A. and Pan, B.S. (1990) The nutritional composition of the major groups of marine organisms. In *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*. 30-54. Z.E. Sikorski, (Ed). CRC Press.
- Silbande, A., Adenet, S., Smith-Ravin, J., Joffraud, J.J., Rochefort, K. and Leroi, F. (2016). Quality assessment of ice-stored tropical yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and influence of vacuum and modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*. 60: 62-72.
- Simeonidou, S., Govaris, A. and Vareltzis, K. (1997). Quality assessment of seven Mediterranean fish species during storage on ice. *Food Research International*. 30(7): 479-484.
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W.K. and Rosnes, J.T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - Significance of microbial growth, activities and safety. *International Journal of Food Science and Technology*. 37(2): 107-127.

- Smyth, C., Brunton, N., Fogarty, C. and Bolton, D. (2018). The effect of organic acid, trisodium phosphate and essential oil component immersion treatments on the microbiology of cod (*Gadus morhua*) during chilled storage. *Foods*. 7(12): 200.
- Speranza, B., Bevilacqua, A., Conte, A., Del Nobile, M.A., Sinigaglia, M. and Corbo, M.R. (2013). Use of desirability approach to predict the inhibition of *pseudomonas fluorescens*, *shewanella putrefaciens* and *photobacterium phosphoreum* in fish fillets through natural antimicrobials and modified atmosphere packaging. *Food and Bioprocess Technology*. 6: 2319-2330.
- Stamatis, N. and Arkoudelos, J. (2007). Quality assessment of *Scomber colias japonicus* under modified atmosphere and vacuum packaging. *Food Control*. 18: 292-300.
- Sullivan, D.J., Azlin-Hasim, S., Cruz-Romero, M., Cummins, E., Kerry, J.P. and Morris, M.A. (2017). Natural antimicrobial materials for use in food packaging. *Handbook of Antimicrobial Coatings*. 181-233.
- Sveinsdottir, K., Martinsdottir, E., Hyldig, G., Jørgensen, B. and Kristbergsson, K. (2002). Application of Quality Index Method (QIM) scheme in shelf-life study of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Food Sciences*. 67: 1570-1579.
- Sveinsdottir, K., Hyldig, G., Martinsdottir, E., Jørgensen, B. and Kristbergsson, K. (2003). Quality Index Method (QIM) scheme developed for farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Food Quality and Preference*. 14: 237-245.
- Taliadourou, D., Papadopoulos, V., Domvridou, E., Savvaidis, I.N. and Kontominas, K.G. (2003). Microbiological, chemical and sensory changes of whole and filleted Mediterranean aquacultured sea bass (*D. labrax*) stored in ice. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83: 1373-1379.
- Tassou, C.C., Drosinos, E.H. and Nychas, G.J.E. (2016). Inhibition of resident microbial flora and pathogen inocula on cold fresh fish fillets in olive oil, oregano, and lemon juice under modified atmosphere or air. *Journal of Food Protection*. 59(1): 31-34.
- Tavakoli, S., Naseri, M., Abedi, E. and Imani, A. (2018). Shelf-life enhancement of whole rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with *reshgak* ice coverage. *Food Science and Nutrition*. 6(4): 953-961.

- Taylor, R.G., Fjaera, S.O. and Skjervold, P.O. (2002). Salmon fillet texture is determined by myofiber-myofiber and myofiber-myocommata attachment. *Journal of Food and Sciences*. 67: 2067-2071.
- Teixeira, B., Fidalgo, L., Mendes, R., Costa, G., Cordeiro, C., Marques, A., Saraiva, J.A. and Nunes, M.L. (2014). Effect of high pressure processing in the quality of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets: Pressurization rate, pressure level and holding time. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 22: 31-39.
- Tejada, M. and Huidobro, A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*. 215(1): 1-7.
- Thakur, A., Walia, M.K. and Kumar, S.L.H. (2013). Nanoemulsion in enhancement of bioavailability of poorly soluble drugs a review. *Pharmacophore*. 4(1), 15-25.
- Tongnuanchan, P. and Benjakul, S. (2014). Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *Journal of Food Science*. 79(7): 1231-1249.
- Torrieri, E., Carlino, P.A., Cavella, S., Fogliano, V., Attianese, I., Buonocore, G.G. and Masi, P. (2011). Effect of modified atmosphere and active packaging on the shelf-life of fresh bluefin tuna fillets. *Journal of Food Engineering*. 105: 429-435.
- Tsironi, T., Stamatiou, A., Giannoglou, M., Velliou, E. and Taoukis, P.S. (2011). Predictive modelling and selection of time temperature integrators for monitoring the shelf life of modified atmosphere packed gilthead seabream fillets. *LWT-Food Science and Technology*. 44(4): 1156-1163.
- Uçak, İ., Özogul, Y. and Durmuş, M. (2011). The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. *International Journal of Food Science and Technology*. 46(6): 1157-1163.
- Van Haute, S., Raes, K., Van der Meeren, P. and Sampers, I. (2016). The effect of cinnamon, oregano and thyme essential oils in marinade on the microbial shelf life of fish and meat products. *Food Control*. 68: 30-39.
- Van Haute, S., Raes, K., Devlieghere, F. and Sampers, I. (2017). Combined use of cinnamon essential oil and MAP/vacuum packaging to increase the microbial and

- sensorial shelf life of lean pork and salmon. *Food Packaging and Shelf Life*. 12: 51-58.
- Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R.K. and Kumar, A. (2015). Essential oils as natural food antimicrobial agents: A review. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*. 55: 1320-1323.
- Volpe, M.G., Siano, F., Paolucci, M., Sacco, A., Sorrentino, A., Malinconico, M. and Varricchio, E. (2015). Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 60: 615-622.
- Wu, J., Ge, S., Liu, H., Wang, S., Chen, S., Wang, J. and Zhang, Q. (2014). Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and Shelf Life*. 2: 7-16.
- Xu, J.L., Riccioli, C. and Sun, D.W. (2015). An overview on nondestructive spectroscopic techniques for lipid and lipid oxidation analysis in fish and fish products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 14(4): 466-477.
- Yerlikaya, P., Gokoglu, N., Topuz, O.K., Gumus, B. and Aydan Yatmaz, H. (2016). Antioxidant activities of citrus albedo and flavedo fragments against fish lipid oxidation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 25 (8): 1339-1347.
- Yesudhasan, P., Lalitha, K. V., Gopal, T.K.S. and Ravishankar, C.N. (2014). Retention of shelf life and microbial quality of seer fish stored in modified atmosphere packaging and sodium acetate pretreatment. *Food Packaging and Shelf Life*. 1: 123-130.
- Zakhariya, S.Y., Fotadar, R. and Prangnell, D. (2015). The effects of two forms of ice on microbiological and physiochemical properties of barramundi (*Lates calcarifer*, Bloch) fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*. 39(6): 2886-2896.
- Zampacavallo, G., Parisi, G., Mecatti, M., Lupi, P., Giorgi, G. and Poli, B.M. (2015). Evaluation of different methods of stunning/killing sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by tissue stress/quality indicators. *Journal of Food Science and Technology*. 52: 2585-2597.

- Zanetti, M., Carniel, T.K., Dalcanton, F., Dos Anjos, R.S., Gracher Riella, H., De Araújo, P.H.H., De Oliveira, D. and Fiori, M.A. (2018). Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review. *Trends in Food Science and Technology*. 81: 51-60.
- Zhao, L., Budge, S., Ghaly, E.A. and Brooks, S.M. (2011). Extraction, purification and characterization of fish pepsin: A critical review. *Journal of Food Processing and Technology*. 2: 6.

